



Caracterização da resistência a *Colletotrichum kahawae* em *Coffea* spp.

André Luís Duarte Parada

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agrónómica

Orientador: Doutor Arlindo Lima

Co-orientador: Licenciado Vítor Várzea

PRESIDENTE - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS - Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Licenciado Vítor Manuel Pinto Várzea, Investigador Auxiliar do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro do Instituto de Investigação Científica Tropical, na qualidade de especialista;

Doutora Andreia Sofia Brotas da Costa Loureiro.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Arlindo Lima, orientador deste trabalho, dirijo o meu sincero agradecimento pela orientação, prestabilidade, valiosas sugestões e críticas e ainda a colaboração oferecida na resolução de todos os problemas relacionados com a realização desta dissertação.

Ao Engenheiro Vítor Várzea, co-orientador deste trabalho, apresento um agradecimento muito especial, pelo apoio científico que sempre me ofereceu, pelo estímulo, pela sua amizade demonstrada bem como pelas constantes revisões deste trabalho.

À Doutora Maria do Céu Silva, pelos preciosos ensinamentos transmitidos, valiosas sugestões, colaboração dispensada e cuidados postos na revisão deste trabalho.

À Dr^a Paula Pereira, o apoio incansável e incondicional na revisão deste trabalho, empenho, incentivo e amizade sempre demonstrados em qualquer circunstância.

À Doutora Leonor Guerra-Guimarães, Doutora Dora Batista, Doutor Pedro Talhinhos e Doutora Helena Azinheira, pela disponibilidade e incentivo demonstrado.

À Doutora Andreia Loureiro, pela disponibilidade e inestimável apoio na elaboração deste trabalho.

À Engenheira Inês Diniz pelo incentivo amigo, preciosa paciência e ajuda na resolução de problemas informáticos.

A todos os funcionários do CIFC, nomeadamente à Célia Lopes, Idalina Gomes, Maria João Bettencourt e à Fernanda Ribeiro, pelo companheirismo, amizade e pelas risadas do dia-a-dia.

À Paula Leandro e à Sandra Emídio, um agradecimento muito especial pelo apoio e toda a ajuda laboratorial constante durante a execução deste trabalho, como também a amizade demonstrada.

Aos meus amigos, em especial à Sandra Silva e à Marta de Sá, pela sua amizade, paciência e boa disposição sempre demonstrada principalmente nos momentos de desespero.

Aos meus pais e ao Silveira pelo apoio incondicional, amizade e disponibilidade que sempre me concederam ao longo da minha vida académica.

Ao Landim, pelas saudades que me deixou das pistas.

Um bem haja a todos.

Resumo

O café é um dos mais valiosos produtos agrícolas no comércio mundial, sendo fundamental para a economia de muitos países em desenvolvimento. Uma das limitações da produção é a antracnose dos frutos verdes (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge. Actualmente, o CBD está limitado ao continente africano, constituindo uma série ameaça para países cafeicultores situados noutros continentes.

Esta doença pode originar prejuízos até cerca de 80%, se não forem tomadas medidas de controlo. O meio de luta mais utilizado para esta doença consiste na aplicação de fungicidas. Contudo, algumas instituições em países cafeicultores encontram-se a desenvolver programas de melhoramento genético com o objectivo de obter, variedades resistentes, a este agente patogénico.

Neste trabalho foi caracterizada a resistência de diferentes híbridos interespecíficos tetraplóides de cafeeiros, pelo método do hipocótilo e seleccionados vários genótipos com diferentes níveis de resistência, a alguns isolados de *C. kahawae*. Observações complementares realizadas em hipocótilos inoculados, com diferentes isolados de *C. kahawae* permitiram caracterizar *dilatory resistance* em genótipos de cafeeiros, classificados como susceptíveis. Foram efectuados também estudos histológicos em hipocótilos, com o objectivo de se avaliar o seu comportamento comparativamente com outros genótipos já conhecidos.

Palavras chave: *Colletotrichum kahawae*, cafeeiro, *dilatory resistance*, resistência, CBD.

Abstract

Coffee is one of the most valuable agricultural products in world trade being crucial to the economies of many developing countries. However its production is constrained by a number of major diseases, including Coffee Berry Disease (CBD) caused by *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge. Currently CBD is limited to Africa, constituting a serious threat to other coffee growing countries in other continents.

This disease is responsible for up to 80% of crop losses, if no control measures are applied. The most widely used method to control this disease involves the application of fungicides. However some institutions in some coffee growing countries are developing breeding programs for the creation of resistant varieties to this pathogen.

In this work resistance of different tetraploid interspecific coffee hybrids were characterized by pre-screening tests and several genotypes with different levels of resistance to some *C. kahawae* isolates were selected. Additional observations were made in hypocotyls inoculated with different isolates of *C. kahawae* allowed the characterization of dilatory resistance in coffee genotypes classified as susceptible. Histological studies were also made in hypocotyls with the aim of evaluating their behaviour compared with other known genotypes.

Keywords: *Colletotrichum kahawae*, coffee varieties, dilatory resistance, resistance, CBD.

Extended abstract

Coffee is one of the most valuable agricultural products in world trade being crucial to the economies of many developing countries. However, its production is constrained by a number of major diseases, including Coffee Berry Disease (CBD) caused by *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge. Currently CBD is limited to Africa, being a serious threat to coffee growing countries in other continents.

This disease is responsible for up to 80% of crop losses, if no control measures are applied. The most widely used method to control this disease involves the application of fungicides. However, some institutions from coffee growing countries as well as some research institutes from other continents where the disease has not yet been reported are developing breeding programs for the creation of resistant varieties for the two mainly major diseases of arabica coffee (coffee leaf rust and coffee berry disease).

The coffee genotypes selected for this study have shown high levels of resistance to coffee leaf rust and are commercial varieties resistant to this disease.

In this work, the aggressiveness and resistance of different tetraploid interspecific coffee hybrids was characterized by pre-screening tests (hypocotyl method) developed by van der Vossen *et al.* (1976). The experiments were conducted in covered trays incubated in the darkness during the first 48 hours at 22° C and then kept under a photoperiod of 12 hours at 19° C. Several genotypes were inoculated with *C. kahawae* isolates from Cameroon (Cam1), Kenya (Que2), Zimbabwe (Zim1), Tanzania (Tan3), Ethiopia (Eti10 and Eti20) and Angola (Ang31) and showed different levels of resistance.

Aggressiveness studies were performed on hypocotyls and detached green berries with isolates from Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti10 and Eti20 and Ang31. Four levels of aggressiveness were established to classify the isolates according to the reactions on inoculated hypocotyls after 22 days.

The isolate Cam1 showed the highest level of aggressiveness on hypocotyls and detached green fruits when compared with other isolates tested.

On detached green berries the isolate Eti20 showed similar aggressiveness as the isolate Cam1 and the isolate Ang31 exhibited the lowest level of aggressiveness. The remaining isolates showed intermediate levels of aggressiveness. All the isolates showed very high levels of aggressiveness on Catimor 45 hypocotyls.

The phenotypic expressions of resistance/susceptibility found between coffee genotypes inoculated with Que2 and Zim1, Zim1 and Tan3 isolates lead to confirm the existence of interactions between coffee genotypes and isolates of the fungus (possible existence of

physiological races). However these results could not be quantified due to insufficient coffee material used in replications and subsequently application of statistical tests.

The resistance tests were performed on 43 coffee genotypes using the pre-screening tests.

All the coffee genotypes inoculated with the isolate Cam1 were susceptible.

On Sarchimor population variability to resistance was found. The coffee genotypes 12859/3, 12859/5 and 13683/35 exhibited the highest level of resistance.

Coffee genotype Sln 11, from India, inoculated with the isolate Que2 showed a moderately level of resistance (MR).

Different levels of dilatory resistance were found on susceptible coffee genotypes. This kind of resistance is very promising and should be further exploited to be studied under field conditions with the objective to characterize field tolerance to this disease.

For cytological studies (using light microscopy, blue lactophenol staining) two Indian cultivars Sln11, S.795 and the Catimor 45 (susceptible control) were selected. The early stages of both *C. kahawae* isolates (Cam1 and Que2) growth were similar in all coffee cultivars. Conidia adhered to the hypocotyls cuticle and germinated producing germ tubes and melanized appressoria, which penetrated directly into the epidermal cell walls with the formation of infection vesicles that grew intra and intercellularly. However, in Sln11 both fungal isolates presented a lower hyphal length comparatively to Catimor 45, while in S.795 the fungal growth did not differ significantly from Sln11 and Catimor 45.

Indian genotypes tested showed potential to be incorporated in breeding programs, but tests with other isolates from the collection of CIFC are needed in order to better characterize their resistance.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Extended abstract	iv
Abreviaturas	xii
1 - Introdução	1
2 - A antracnose dos frutos verdes do cafeeiro	4
2.1 - O agente patogénico – <i>Colletotrichum kahawae</i>	5
2.1.1 - Taxonomia	5
2.1.2 - Variabilidade em <i>Colletotrichum kahawae</i>	6
2.2 - O cafeeiro – <i>Coffea</i> spp.	8
2.2.1 - Origem e distribuição geográfica	8
2.2.2 - Taxonomia	9
2.2.3 - Características gerais.....	10
2.3 - A doença	11
2.3.1 - Sintomatologia	11
2.3.2 - Susceptibilidade dos frutos verdes	12
2.3.3 - Ciclo da doença	12
2.3.4 - Processo de infecção	13
2.3.5 - Modo de dispersão dos conídios	14
2.3.6 - Fontes de inóculo	14
2.3.7 - Epidemiologia.....	15
2.3.8 - Efeito da altitude e da sombra	16
2.3.9 - Meios de Luta.....	17
2.3.9.1 - Luta química.....	17
2.3.9.2 - Luta cultural.....	18
2.3.9.3 - Luta biológica	18

2.3.9.4 - Medidas de quarentena.....	19
2.3.9.5 - Luta genética.....	19
2.3.10 - Hereditariedade da resistência a <i>C. kahawae</i> em <i>Coffea</i> spp.....	20
2.3.11 - Mecanismos de resistência do cafeeiro a <i>C. kahawae</i>	20
3 - Caracterização da resistência a <i>Colletotrichum kahawae</i> em diferentes genótipos de cafeeiro	23
3.1 - Material e métodos	23
3.1.1 - Material biológica	23
3.1.2 - Métodos	25
3.2 - Resultados e discussão	29
3.2.1 - Caracterização da patogenicidade de isolados de <i>C. kahawae</i>	29
3.2.2 - Caracterização da resistência em genótipos de cafeeiro.....	38
3.2.3 - Caracterização de <i>dilatory resistance</i> a <i>Colletotrichum kahawae</i>	40
3.2.4 - Processo de infecção do fungo	46
4 - Conclusões e perspectivas.....	53
Referências Bibliográficas.....	55
Anexos	I
Anexo I – Percentagem cumulativa de hipocótilos de diversos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com <i>C. kahawae</i> ao longo dos ensaios.	II
Anexo II – Índice de Agressividade	XII
Anexo III – Tratamento estatístico.....	XXIII
Anexo IV – Resumo e painel apresentado em Congresso Internacional	XXIV

Índice de Quadros

Quadro 1 - Isolados de <i>Colletotrichum kahawae</i> utilizados no presente estudo, sua designação, ano de entrada no CIFC e origem geográfica.	23
Quadro 2 - Genótipos de cafeeiros da coleção do CIFC utilizados no presente estudo, designação e sua origem geográfica.....	24
Quadro 3 - Escala de classificação utilizada em testes de inoculação em hipocótilos (adaptada de van der Graaff, 1981).	26
Quadro 4 - Classes de agressividade (1-4) dos isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , inoculados em hipocótilos, de cada genótipo de cafeeiro.	30
Quadro 5 - Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados da variedade Catimor 45 (controle), 10 dias após inoculação com os isolados Ang31, Eti10, Que2, Zim1, Tan3, Eti20 e Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	31
Quadro 6 - Frequência de infecção, em frutos verdes destacados de Catimor 45, inoculados com os isolados Zim1, Ang31, Eti10, Tan3, Que2, Eti20 e Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	32
Quadro 7 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) do isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em frutos verdes, diferentes horas após a inoculação.	33
Quadro 8 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) do isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em frutos verdes, diferentes horas após inoculação.	33
Quadro 9 - Percentagem de conídios germinados dos isolados Cam1 e Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em frutos verdes, em diferentes horas após inoculação.	34
Quadro 10 - Percentagem de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelos isolados Cam1 e Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em frutos verdes, diferentes horas após inoculação.	35
Quadro 11 - Percentagem de apressórios melanizados diferenciados pelos isolados Cam1 e Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em frutos verdes, diferentes horas após inoculação.....	35
Quadro 12 - Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados em diferentes genótipos de cafeeiro 10 dias após inoculação com os isolados de Cam1 e Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	36
Quadro 13 - Expressões fenotípicas entre genótipos de cafeeiro e os isolados Que2 e Zim1 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	37

Quadro 14 - Expressões fenotípicas entre genótipos de cafeeiro e os isolados Zim1 e Tan3 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	37
Quadro 15 - Percentagem de Hipocótilos Resistentes (%HR) e Classes de Resistência (CR) de genótipos de cafeeiro 22 dias após inoculação com os isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de <i>Colletotrichum kahawae</i> ...39	39
Quadro 16 - Diferença entre a percentagem cumulativa de hipocótilos com reacção 5 verificada entre Catimor 45 e cada genótipo aos 8, 10 e 14 dias após inoculação com os isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	41
Quadro 17 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , ao longo do ensaio.....	43
Quadro 18 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln 11 e S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , ao longo do ensaio.....	44
Quadro 19 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln 11 e S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , ao longo do ensaio.....	44
Quadro 20 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 832/2 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , ao longo do ensaio.....	45
Quadro 21 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 832/2 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> , ao longo do ensaio.....	45
Quadro 22 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelo isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, 15 horas após inoculação.	47
Quadro 23 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelo isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, 15 horas após inoculação.	47
Quadro 24 - Valores médios do comprimento das hifas do isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> no interior dos hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, em diferentes tempos após a inoculação.....	50

Quadro 25 - Valores médios do comprimento das hifas do isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> no interior dos hypocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, em diferentes tempos após a inoculação.....	50
--	----

Índice de Figuras

Fig. 1 - Frutos de cafeeiro com sintomas de antracnose (CBD).	11
Fig. 2 - Crescimento e desenvolvimento dos frutos, mostrando os estados resistentes e susceptíveis a <i>Colletotrichum kahawae</i>	12
Fig. 3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de <i>Colletotrichum kahawae</i> (agente causal da antracnose dos frutos verdes do cafeeiro.	13
Fig. 4 - Diagramas representando os principais factores com influência na epidemia do CBD.....	16
Fig. 5 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i>	43
Fig. 6 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln11, S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 (a) e Que2 (b) de <i>Colletotrichum kahawae</i>	44
Fig. 7 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos HDT 832/2 e Catimor45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 (Fig. 7a) e Que2 (Fig. 7b) de <i>Colletotrichum kahawae</i>	45
Fig. 8 - Germinação de conídios e formação de apressórios dos isolados Cam1 (a) e Que2 (b) de <i>Colletotrichum kahawae</i> na superfície de hipocótilos de Catimor 45...48	
Fig. 9 - Processo de infecção do isolado Cam1 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em hipocótilos dos genótipos Sln 11 (Figs. 9 a,b,c) e Catimor 45 (Fig. 9d).....	49
Fig. 10 -Respostas celulares induzidas pelo isolado Que2 de <i>Colletotrichum kahawae</i> em hipocótilos dos genótipos Sln 11 e Catimor 45, 10 dias após inoculação.....	52

Abreviaturas

AFLP – Amplified fragment length polymorphism

CA – Classes de agressividade

CBD – Coffee Berry Disease

CCRI – Central Coffee Research Institute

CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

CR – Classes de Resistência

d.a.i – dias após inoculação

DNA– Ácido desoxirribonucleico

FI – Frequência de Infecção

GCV – Grupos de Compatibilidade Vegetativa

h.a.i – horas após inoculação

h – horas

HDT – Híbrido de Timor

HR – Hipocótilos Resistentes

IA – Índice de Agressividade

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná

IICT – Instituto de Investigação Científica Tropical

ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat

ITS – Internal Transcribed Spacer

MDS – Teste da Mínima Diferença Significativa

MEA – Gelose de extracto de malte

mt DNA – DNA mitocondrial

OIC – Organização Internacional do Café

rDNA – DNA ribossomal

RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polimorphism

RH – Reacção de hipersensibilidade

RNA – Ácido ribonucleico

UV – Ultravioleta

VNTR – Variable number tandem repeats

1 - Introdução

O café é um dos produtos agrícolas mais valioso do mundo, dependendo mais de 125 milhões de pessoas das actividades envolvidas na sua produção, processamento, transporte e comercialização (Osório, 2002).

A produção mundial de café totalizou 128,1 milhões de sacas (60 kg cada saca), no ano de colheita de 2008/09, aumentando 7,7% em relação ao ano anterior. Nesse ano a produção de café Arabica totalizou 78,6 milhões de sacas, enquanto a produção de café Robusta atingiu 49,5 milhões de sacas. A América do Sul foi o continente com maior produção contribuindo com 47% (60,2 milhões de sacas), seguindo-se a Ásia e a Oceânia com 27,4% (35,1 milhões de sacas), o México e a América Central com 13,5% (17,3 milhões de sacas) e África com 12,1% (15,5 milhões de sacas). O Brasil foi o principal produtor de café (35,7% da produção mundial), seguido do Vietname e da Colômbia, respectivamente com 12,4% e 8,2% (www.ico.org, 2010).

O consumo mundial de café tem aumentado, sobretudo devido ao consumo interno nos países exportadores, tendo sido registado o consumo de 130 milhões de sacas em 2008/09, comparado com 127,2 milhões consumidos em 2007/08 (www.ico.org, 2010).

As exportações de café, de Janeiro a Outubro de 2010 atingiram 78,9 milhões de sacas, enquanto no mesmo período de 2009 se registaram 81,5 milhões, o que se traduz numa redução de 3,3%. Actualmente, a escassez de café Arabica de alta qualidade, os atrasos na colheita e distribuição provocados por mau tempo, como a tempestade tropical Agatha que afectou países da América Central, tornam precário o equilíbrio entre a oferta e a procura. Assim, a produção precisará de ser suficientemente grande para permitir um reabastecimento das reservas mundiais (www.ico.org, 2010).

As pragas e doenças são algumas das limitações da cultura do cafeeiro. Variam de região para região, de cafezal para cafezal e de um ano para o outro. São responsáveis por atrasos no desenvolvimento das plantas, perdas na sua produtividade e, ainda, em alguns casos levam à redução da vida produtiva do cafeeiro, podendo causar a sua morte.

Das pragas que causam maior impacte, destacam-se a lagarta mineira *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Méneville), a broca do fruto *Hypothenemus hampei* (Ferrari) e nemátodes *Meloidogyne exigua* Goeldi (Kumar, 1988; Vega *et al.*, 2006).

Das doenças mais importantes destacam-se, a ferrugem alaranjada *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., antracnose dos frutos verdes *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, a cercosporiose *Cercospora coffeicola* B. & Cke e a mancha aureolada *Pseudomonas syringae* Van Hall (Sridhar & Subramanian, 1966; Agnihothrudu *et al.*, 1986; Rodrigues, 2002).

O Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) do Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT) foi criado, em 1955, com o objectivo principal de centralizar, a nível internacional, o estudo da ferrugem alaranjada (principal doença do cafeeiro), num local fora dos países cafeicultores, onde não houvesse perigo de introduzir o seu agente patogénico ou suas raças fisiológicas também denominadas estirpes (Rodrigues, 2002).

Como um dos resultados práticos da investigação realizada no CIFC, sobre a ferrugem alaranjada do cafeeiro, pode referir-se que mais de 90% das variedades de cafeeiro com resistência à ferrugem, cultivadas actualmente em todo o mundo, tiveram origem directa ou indirecta em estudos desenvolvidos neste Centro de Investigação, a partir de uma população de cafeeiros denominada “Híbrido de Timor (HDT)”. A descoberta desta população em Timor, no início dos anos 60, permitiu caracterizar cafeeiros com resistência a todas as raças fisiológicas de *H. vastatrix* existentes. Alguns desses cafeeiros simples ou híbridos com variedades locais melhoradas, com boas características agrónomicas e de bebida tais como CIFC 19/1 Caturra x CIFC 832/1 HDT e CIFC 971/10 Villa Sarchi x CIFC 832/2 HDT, cujas populações foram mais tarde designadas respectivamente por Catimor e Sarchimor, foram distribuídos gratuitamente pela maioria dos países cafeicultores (Rodrigues *et al.*, 2004).

Em 1989 foi criada uma nova linha de investigação no CIFC sobre a antracnose dos frutos verdes do cafeeiro, designada nos países de língua inglesa por *Coffee Berry Disease* (CBD), que tem como agente causal o fungo *Colletotrichum kahawae*. Actualmente, o CBD está apenas limitado ao continente africano, constituindo, no entanto, uma série ameaça para países cafeicultores situados noutros continentes.

Esta linha de investigação suscitou grande interesse por parte das instituições de países onde já existia a doença e de países onde a doença ainda não existia mas poderia vir a constituir uma série ameaça. À semelhança das actividades desenvolvidas para a ferrugem alaranjada, esta linha de investigação tem como principais objectivos: a) caracterizar a variabilidade de *C. kahawae*; b) identificar e caracterizar fontes de resistência a esta doença visando a obtenção de variedades de cafeeiro com resistência simultânea à ferrugem alaranjada e ao CBD.

A antracnose dos frutos verdes do cafeeiro pode ser responsável pela perda de 50-80% de produção, em variedades susceptíveis de Arabica, durante os períodos em que as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento de epidemias severas (temperaturas baixas e humidade prolongada) se não forem aplicadas medidas de luta química (van der Vossen & Walyaro, 2009). Anualmente, o prejuízo provocado na produção de café Arabica no continente Africano, por perda de produção devido ao CBD e ao custo da aplicação da luta química é estimado em cerca de 300 a 500 milhões de dólares americanos (van der Vossen & Walyaro, 2009). As perdas de produção causadas por esta doença, os

custos elevados da luta química e o seu impacto ambiental negativo mostram a importância da utilização de variedades de cafeeiro resistentes.

O presente trabalho encontra-se integrado no âmbito da Área Temática 1 do CIFIC “Cooperação internacional com vista à criação de variedades de cafeeiros com resistência duradoura às principais doenças (ferrugem alaranjada e antracnose dos frutos verdes)”.

Referem-se algumas das actividades realizadas nesta Área Temática:

- 1) Caracterização da variabilidade (patogénica, bioquímica e molecular) de *H. vastatrix* e *C. kahawae*;
- 2) Caracterização da resistência em *Coffea* spp. a *H. vastatrix* e *C. kahawae*;
- 3) Estudos genéticos e moleculares de *Coffea* spp. tendo em vista o melhoramento para a resistência às principais doenças;
- 4) Apoio a programas de melhoramento genético, em países cafeicultores. Formação de técnicos e investigadores sobre vários aspectos relacionados com o controlo destas duas doenças por meio de variedades resistentes.

Assim, desta forma este trabalho teve como principais objectivos: **a)** caracterização da patogenicidade de isolados de *C. kahawae*, proveniente de diferentes origens geográficas; **b)** caracterização da resistência a *C. kahawae* em genótipos de cafeeiro que são utilizados como variedades comerciais resistentes à ferrugem em diferentes países cafeicultores; **c)** caracterização histológica da resistência em hipocótilos das variedades indianas, comparativamente a um genótipo susceptível.

2 - A antracnose dos frutos verdes do cafeeiro

A antracnose dos frutos verdes foi registada pela primeira vez no Quênia em 1922, junto à fronteira do Uganda (McDonald, 1926), vindo a ser considerada a doença do cafeeiro mais importante na África central e oriental, além da ferrugem alaranjada (causada por *Hemileia vastatrix*). Nos anos 50 do século XX, o CBD atacava já as principais regiões produtoras de café no Quênia. Robinson (1974) sugeriu que, mesmo antes da implantação da cultura do cafeeiro neste país, o agente patogénico já existia como espécie saprófita ou medianamente parasítica nos progenitores diplóides naturais de *Coffea arabica* L., como *C. eugenoides* Moore, que, entretanto ficou geograficamente isolado de *C. arabica*. Esta ausência prolongada de contacto entre o agente patogénico e *C. arabica* teria provocado a erosão dos genes responsáveis pela resistência a *C. kahawae* nesta espécie, tornando-a susceptível. O aparecimento de CBD na espécie *C. arabica* não foi mais do que um reencontro com um agente patogénico ancestral.

A doença espalhou-se progressivamente pelo continente africano, surgindo em Angola em 1930, Zaire em 1937, Congo em 1939, Camarões em 1955-1957, Tanzânia em 1964, Uganda em 1959, Etiópia em 1971 e Malawi em 1985 (van der Graaff, 1981; Wrigley, 1988; Biratu, 1995; Várzea, 1995). De uma forma geral, o CBD está restringido às regiões cafeeiras, situadas entre 15° N e 20° S de latitude e, limitado a altitudes superiores a 1500 metros, caracterizadas por um clima fresco e húmido que favorece a dispersão dos esporos e o desenvolvimento da doença, correspondente ao clima de eleição de *C. arabica* (Mulinge, 1971; Muller, 1980). Contudo, a doença já foi presenciada a altitudes mais baixas, a 1196 metros, na estação experimental de Kawanda, no Uganda (Birikunzira, 1982). Em 1949 foi observada pela primeira vez, a presença da doença em plantações de *C. canephora* Pierre ex Frohener e *C. excelsa* L., no oeste da República Central Africana (Saccas, 1965). Actualmente, antracnose dos frutos verdes está restrita ao continente africano em cafeeiros de Arabica, onde é endémica. Contudo, regiões cafeeiras que se situem a elevadas altitudes, na América Latina e na Ásia, podem ser muito favoráveis ao desenvolvimento do fungo, constituindo esta doença uma série ameaça para os principais produtores de café do mundo (Silva *et al.*, 2006; van der Vossen, 2006; van der Vossen & Walyaro, 2009).

2.1 - O agente patogénico – *Colletotrichum kahawae*

2.1.1 - Taxonomia

A antracnose dos frutos verdes do cafeeiro, tal como já foi referido anteriormente, é provocada pelo fungo *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller & P.D. Bridge (Waller *et al.*, 1993). Este é um fungo mitospórico que se encontra actualmente classificado da seguinte forma (Kirk *et al.*, 2008):

Divisão – Ascomycota

Classe – Sordariomycetes

Sub-Classe – Sordariomycetidae

Ordem – Incertae sedis

Família – Glomerellaceae

Género – *Colletotrichum*

Espécie – *C. kahawae* Waller & Bridge

A primeira descrição de um fungo do género *Colletotrichum* no cafeeiro foi feita por Noack (Noack, 1901). Este autor designou por *C. coffeanum* uma forma não patogénica do género *Colletotrichum* encontrada em frutos verdes de cafeeiro provenientes do Brasil (Waller *et al.*, 1993). Contudo, esta designação foi utilizada, durante mais de 70 anos, para todos os isolados de *Colletotrichum* do cafeeiro, tanto patogénicos como saprofíticos.

O fungo original, ao qual Noack deu o nome de *C. coffeanum*, era provavelmente *C. gloeosporioides*. A descrição original de *C. coffeanum* não permite distingui-lo de *C. gloeosporioides*, não sendo, deste modo, válida para a descrição do agente patogénico responsável pelo CBD (Firman & Waller, 1977).

No Quénia, em 1926, McDonald estudou a patogenicidade em *C. coffeanum* e agrupou os isolados em três formas distintas: uma forma saprofítica, uma forma medianamente parasítica onde ocorrem lesões superficiais nos frutos maduros mas nunca penetrando nos frutos ou causando a perda de produção e, por fim, uma forma fortemente parasítica. Esta última, foi considerada a responsável pelas lesões negras em depressão encontradas nos frutos verdes de cafeeiros Arabica, que foi denominada por *Coffee Berry Disease* (Wrigley, 1988). É possível a distinção dessas diversas formas consoante a morfologia de esporos formados em gelose de extracto de malte (MEA) (Waller *et al.*, 1993).

Rayner (1952) identificou a forma patogénica capaz de causar doença, tendo por base a coloração esverdeada do micélio de isolados do agente patogénico passando a designá-la taxonomicamente por *C. coffeanum* Noack var. *virulans*. Gibbs (1969) definiu quatro grupos de *Colletotrichum* provenientes dos ramos e frutos de *C. arabica*, baseado nas

características morfológicas das colónias em MEA. Sendo estes, o *ccm* (*C. coffeanum* “micélio”) – constituído por isolados que têm crescimento rápido, abundante micélio aéreo claro e conídios formados directamente nas hifas; *cca* (*C. coffeanum* “acérvulo”) – isolado com um crescimento moderado, micélio aéreo claro e conídios curtos formados em acérvulos; *ccp* (*C. coffeanum* “pink”) - isolado com um crescimento lento, abundante micélio aéreo rosado e conídios de forma mais alongada; e *cbd* (*C. coffeanum* “var.virulans”) - com crescimento lento, abundante micélio aéreo de coloração cinza-escuro e conídios formados directamente sobre as hifas. Somente o último grupo se mostrava patogénico para os frutos verdes. Hindorf (1970) descreveu seis táxones de *Colletotrichum* isolados de cafeeiro Arabica, no Quênia. Desses seis táxones só um provoca a antracnose dos frutos verdes e cujo epíteto passou a ser designado *C. coffeanum* Noack *sensu* Hindorf. Para os outros cinco táxones, sem capacidade de provocar a antracnose dos frutos verdes, Hindorf (1970) comparou as características culturais dos seus isolados em MEA (Oxoid) a 2% contendo 0,02% de estreptomicina e denominou-os por *C. acutatum* Simmonds, *C. gloeosporioides* Penz “forma de micélio branco”, *C. gloeosporioides* Penz “forma de micélio esverdeado”, *C. gloeosporioides* Penz “forma de acérvulos” e *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Shrenk. Contudo, Waller *et al.* (1993) verificaram que isolados de *C. coffeanum sensu* Hindorf possuíam características morfológicas e bioquímicas diferentes das outras espécies saprófitas, sugerindo poder tratar-se de uma espécie independente. Foi proposto a alteração do nome *Colletotrichum coffeanum sensu* Hindorf para *C. kahawae* J.M. Waller & P.D. Bridge.

Sreenivasaprasad *et al.* (1993), pelo estudo por RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) do rRNA e do mtDNA, observaram uma grande homologia genética entre isolados do agente patogénico responsável pelo CBD em África e *C. gloeosporioides* de cafeeiro de outros hospedeiros, e propuseram a designação científica de *C. gloeosporioides* f. sp *kahawae*. Contudo, esta não foi aceite pela comunidade, pelo que se mantém a designação de *C. kahawae* para este agente patogénico, desde 1993.

2.1.2 - Variabilidade em *Colletotrichum kahawae*

A variabilidade da espécie *C. kahawae* tem sido amplamente estudada com base em características morfoculturais e patogénicas, na formação de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV), e em estudos isoenzimáticos e moleculares (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993; Beynon *et al.*, 1995; Omondi *et al.*, 1997; Manga, 1999; Gichuru *et al.*, 2000; Várzea *et al.*, 2002a, 2002b; Derso & Waller, 2003; Loureiro, 2008; Bridge *et al.*, 2008; Manuel *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010).

Os testes de patogenicidade efectuados, em diferentes genótipos de cafeeiro, com isolados de *C. kahawae* provenientes da mesma ou de diferentes origens geográficas têm mostrado variações na agressividade dos isolados (Omondi *et al.*, 1997, 2000; Derso & Waller, 2003). Alguns autores sugerem até a existência de raças fisiológicas dentro desta espécie nomeadamente devido à ocorrência de interacções diferenciais aquando da inoculação de diferentes genótipos de cafeeiros (na maioria dos casos híbridos interespecíficos tetraploídes) com isolados de várias origens geográficas (Rodrigues *et al.*, 1992; Várzea *et al.*, 1993).

Nos estudos efectuados por meio da formação de GCV embora não se distingam diferentes GCV dentro da população de *C. kahawae* foi possível diferenciar sub-grupos de isolados (Manga *et al.*, 1997, 2001; Gichuru *et al.*, 2000; Várzea *et al.*, 2002a). Por exemplo, os trabalhos desenvolvidos por Bridge *et al.* (2008), com GCV, confirmam a separação de isolados provenientes da África Oriental de isolados provenientes da África Ocidental.

Os estudos isoenzimáticos preliminares efectuados por Várzea (1995), com as isoenzimas da α -esterase e fosfatase ácida revelaram a existência de variabilidade entre os isolados de *C. kahawae*. Também mais recentemente Loureiro (2008), baseado na análise da actividade das enzimas esterase, fosfatase ácida e alcalina, peroxidase, superóxido dismutase e malato desidrogenase, através da técnica de focagem isoelectrica, observou a existência de polimorfismo entre isolados de *C. kahawae* provenientes de diferentes regiões geográficas. A isoenzima fosfatase alcalina revelou ser a mais eficaz na distinção de isolados em *C. kahawae*.

Estudos moleculares efectuados utilizando as técnicas RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), RFLP, estudo da região ITS (*Internal transcribed spacer*) e VNTR (*Variable number tandem repeats*) mostraram a ausência de variação genética nos isolados de *C. kahawae* estudados (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993; Beynon *et al.*, 1995; Omondi *et al.*, 1997; Manga, 1999; Derso & Waller, 2003; Loureiro 2008; Bridge *et al.*, 2008). Por outro lado, Bridge *et al.* (2008), na análise por AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) de isolados de *C. kahawae* provenientes de vários países africanos (Burundi, Camarões, Etiópia, Malawi, Zâmbia e Zimbabué), verificaram a existência de uma variabilidade mínima entre isolados. Todos os isolados provenientes do Quénia apresentaram o mesmo perfil, tendo os isolados oriundos dos Camarões, assim como um isolado proveniente do Malawi, apresentado um perfil diferente dos restantes. Também Manuel *et al.* (2010) utilizando a técnica de ISSR (*Inter-simple sequence repeat*) e a sequenciação da região ITS do rDNA (DNA ribossomal), verificaram, a existência de alto grau de homogeneidade entre os isolados de *C. kahawae* provenientes de Angola.

Recentemente a abordagem multi-locus efectuada por Silva *et al.* (2010), em cerca de 50 isolados de *C. kahawae* provenientes de nove países africanos, apesar de confirmar a baixa

variabilidade genética entre isolados, permitiu a sua discriminação, em três grupos divergentes correlacionados com a sua origem geográfica: Angola, Camarões e África Oriental.

2.2 - O cafeeiro – *Coffea* spp.

2.2.1 - Origem e distribuição geográfica

O género *Coffea* engloba 103 espécies, das quais apenas *C. arabica* (cafeeiro Arabica) e *C. canephora* Pierre ex Frohener (cafeeiro Robusta) são importantes do ponto vista económico (Cros *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2006). Todas as espécies do género *Coffea* são provenientes das florestas intertropicais de África, Madagascar e das Ilhas do Oceano Índico (Mascarenhas e Ilhas Comoro) (Cros *et al.*, 1998).

A espécie *C. arabica* é originária das zonas montanhosas da Abissínia, entre 1300 e 1900 metros de altitude, e é autogâmica (Ferrão, 2009). O cafeeiro Arabica é cultivado nas regiões com temperaturas moderadas da zona tropical e subtropical, em especial na América Latina, África Central e Oriental, Índia e Ásia (Rodrigues Jr., 2002). Esta espécie está bem adaptada a altitudes elevadas, entre 1000 e 2500 metros de altitude, quedas pluviométricas bem distribuídas (1500-2000 mm), intercaladas por um período seco normalmente inferior a 3 meses. A sua temperatura ideal de crescimento é de 20° C, embora tolere bem temperaturas entre 15-24° C (www.ico.org, 2010).

Algumas técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas no estudo da origem de *C. arabica*, uma vez que alguns estudos apontam para que *C. eugenoides* e *C. congensis* Frohener sejam os progenitores diplóides do cafeeiro Arabica (Raina *et al.*, 1998), enquanto outros autores afirmam que sejam *C. eugenoides* e *C. canephora* (Orozco-Castillo *et al.*, 1996; Cros *et al.*, 1998; Moncada & McCouch, 2004). Em *C. arabica* têm sido exploradas as seguintes variedades comerciais: Bourbon Vermelho, Bourbon Amarelo, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo, Mundo Novo, Blue Mountain, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Pacas, San Ramon, Villa Lobos e Villa Sarchi (Carvalho, 2008). A espécie *C. canephora* é originária da África Ocidental Tropical e encontra-se distribuída por Zaire, Sudão, Uganda e Angola (Wrigley, 1988; Ferrão, 2009). É uma espécie que se adapta bem a regiões de baixa altitude, desde o nível do mar até aos 700 metros, uma precipitação intensa (2000-3000 mm anuais), e a temperatura ideal de crescimento ronda os 27° C mas tolera temperaturas entre 24-30° C (www.ico.org, 2010).

As principais variedades de *C. canephora* são os Robustas (Typica, Gosseweilleri, Welwitschii), Kouillon (Conillon), Guarani, Laurentii, Oka, Uganda, Crassifolia e Bukobensis. O progressivo aumento de interesse dos mercados internacionais pelo café Robusta é

assumido pelo seu preço mais baixo e pela sua utilização na indústria do café solúvel (Wrigley, 1988; Ferrão, 2009).

2.2.2 - Taxonomia

O cafeeiro pertence à sub-família Ixoroideae (Andreasen & Berner, 2000; Davis *et al.*, 2006), que é formado por dois géneros, *Coffea* e *Psilanthus* (Bridson & Verdcourt, 1988).

Segundo Cronquist (1988), a classificação taxonómica do género *Coffea* é a seguinte:

Reino – Plantae

Divisão – Magnoliophyta

Classe – Magnoliopsida

Ordem – Rubiales

Família – Rubiaceae

Género – *Coffea*

A primeira descrição botânica da planta de café foi feita por A. de Jussieu, em 1713, tendo como base uma única planta, originária do Jardim Botânico de Amesterdão. Classificou-a como *Jasminum arabicanum*, homenageando a semelhança do aroma das suas flores com as do jasmim e a sua origem nas terras da Arábia (Correia, 1995; Ferrão, 2009). Em 1737, o botânico sueco Carolus Linnaeus integrou-a no género *Coffea*, com uma única espécie conhecida naquela data *Coffea arabica* L. (Charrier & Berthaud, 1985). Na década de 40 do século XX, Augusto Chevalier construiu para os diferentes cafeeiros conhecidos uma chave taxonómica bastante completa. Esta classificação das espécies do género *Coffea* assentou quase exclusivamente nas características morfológicas e na sua distribuição geográfica. Chevalier dividiu o género *Coffea* em quatro secções: *Paracoffea*, *Argocoffea*, *Mascarocoffea* e *Eucoffea*. A secção *Eucoffea* destaca-se por integrar as plantas com interesse económico e foi subdividida em cinco subsecções de acordo com vários critérios: coloração do fruto (*Erythrocoffea*, *Melanocoffea*), altura da planta (*Nanocoffea*), consistência da folha (*Pachycoffea*) e distribuição geográfica (*Mozambicoffea*) (Charrier & Berthaud, 1985; Wrigley, 1988).

Na década de 80 no século XX houve um aumento significativo dos estudos taxonómicos a nível citotaxonómico, citogenético, geográfico, bioquímico e serológico no sentido de se fazer uma revisão a esta classificação proposta por Chevalier.

A classificação mais recente considera o género *Coffea* subdividido em dois sub-géneros: *Coffea* e *Barocoffea*. O sub-género *Coffea* engloba as espécies economicamente

importantes enquanto o sub-gênero *Barocoffea* engloba apenas três espécies originárias das florestas secas do oeste de Madagascar (Davis, 2003; Davis *et al.*, 2006).

A aplicação de técnicas de biologia molecular, tem auxiliado o estudo filogenético e da variabilidade genética dentro do gênero *Coffea*. Estes estudos revelam resultados muito semelhantes aos obtidos pela taxonomia clássica, confirmando a origem africana do gênero e a sua diferenciação em numerosas espécies (Orozco-Castillo *et al.*, 1996; Cros *et al.*, 1998; Aga *et al.*, 2003; Moncada & McCouch, 2004; Poncet *et al.*, 2006).

O gênero *Coffea* é complexo e de grande diversidade genética, cuja taxonomia está sujeita a frequentes revisões resultantes de inovações introduzidas nos métodos modernos de biologia molecular que, em conjugação com a aplicação dos métodos taxonômicos clássicos, visaram um conhecimento mais aprofundado da variabilidade genética de *Coffea*, de forma a suportar os programas de melhoramento (Ruas *et al.*, 2003).

2.2.3 - Características gerais

O cafeeiro é uma planta dicotiledónea, perene e de porte arbustivo. Apresenta um caule vertical (ortotrópico), a partir do qual se diferenciam pares de ramos laterais e opostos (plagiotrópicos), formando ângulos característicos conforme a variedade. Estes ramos são os únicos que produzem flores e frutos nas axilas das folhas formadas no ano anterior. As folhas são pecioladas, opostas, ovais ou lanceoladas, crescem aos pares, a sua coloração pode variar entre amarelo e verde-escuro, o seu tamanho pode variar entre 1 e 40 cm de acordo com a espécie e inserem-se nos ramos laterais num mesmo plano e na posição oposta da outra folha. Cada inflorescência, compreende duas a seis flores originadas em curtas ramificações, de um eixo floral formado numa axila foliar de um ramo plagiotrópico em plantas com 2 a 3 anos de idade. As flores abrem em média 8 a 12 dias após as chuvas e duram cerca de 3 dias. Os frutos são drupas, normalmente carnudas, de coloração verde antes de amadurecer, tornando-se depois amarelos ou vermelhos. No interior do fruto, encontram-se normalmente duas sementes revestidas por endocarpo e mesocarpo. As sementes têm uma forma elíptica ou oval e são plano-convexas (Purseglove, 1974; Wrigley, 1988; Cardoso, 1994).

De todas as espécies do gênero *Coffea*, apenas *C. arabica* é autogâmica e alotetraplóide com $2n=44$ cromossomas, apresentando cerca de 9 a 10% de fecundação cruzada.

As restantes espécies, nomeadamente *C. canephora*, *C. dewevrei*, *C. congensis*, *C. eugenioides*, *C. racemosa*, *C. stenophylla* são alogâmicas e diplóides com $2n=22$ cromossomas (Wrigley, 1988; Carvalho *et al.*, 1969; Cardoso, 1994; Cros *et al.*, 1998).

O cafeeiro Arabica produz café de melhor qualidade e com menor teor em cafeína (0,8 a 1,4%), do que o Robusta (1,7 a 4,0%), sendo no entanto mais vulnerável a pragas e doenças (Wilson, 1985; Correia, 1995).

2.3 - A doença

2.3.1 - Sintomatologia

O CBD ataca os frutos em todos os estados de crescimento, flores e ocasionalmente inflorescências não abertas e folhas, contudo, os maiores estragos e perdas são verificados nos frutos verdes (Firman & Waller, 1977; Masaba & Waller, 1992; Silva *et al.*, 2006). Existem dois tipos de sintomas nos frutos verdes: lesões activas e lesões tipo *scab*. As lesões activas começam por pequenas manchas negras em depressão que podem desenvolver-se rapidamente, cobrindo toda a superfície do fruto (Fig.1). Sob condições de humidade elevada é produzido na superfície da lesão uma massa de esporos de cor rosada. Os frutos atacados podem cair ou permanecerem mumificados na árvore, mantendo a capacidade de esporular durante vários meses após a infecção ter ocorrido (Masaba & Waller, 1992).



Fig. 1 - Frutos de cafeeiro com sintomas de antracnose (CBD).

As lesões tipo *scab*, também designadas por sarna, caracterizam-se por pequenas manchas de cor camurça em depressão, de pequenas dimensões, formato variável, geralmente superficiais, sobre as quais podem ou não aparecer acérvulos dispersos em círculos concêntricos. Neste tipo de lesões, as camadas mais profundas do fruto não são normalmente invadidas pelo fungo (Várzea *et al.*, 2002), uma vez que as camadas da feloderme e da felogene servem de barreira entre o tecido infectado e o tecido são (Masaba & van der Vossen, 1982). As lesões tipo *scab* podem evoluir para lesões activas na fase de amadurecimento dos frutos, não afectando o crescimento e desenvolvimento dos frutos e

não tendo também efeitos detectáveis na produção (Masaba & Waller, 1992). As lesões tipo *scab* são geralmente o único tipo de lesão a aparecer em variedades de cafeeiros resistentes, podendo também aparecer em cafeeiros susceptíveis quando as condições ambientais são adversas ao desenvolvimento da doença (Firman & Waller, 1977; Masaba & Waller, 1992; Várzea *et al.*, 2002b).

2.3.2 - Susceptibilidade dos frutos verdes

A susceptibilidade dos frutos do cafeeiro (em variedades susceptíveis) a este agente patogénico, depende do seu estado de desenvolvimento, podendo ser distinguidas três fases: 1ª fase em que os frutos se consideram susceptíveis e que abrange o período entre a 8ª e a 12ª semana; a 2ª fase onde os frutos se encontram muito susceptíveis e abrange o período entre a 12ª e a 24ª semana e por fim, a 3ª fase, corresponde ao período em que os frutos são menos susceptíveis e tem início na 25ª semana. Nesta última fase, os frutos apresentam uma resistência bastante elevada, podendo haver uma paragem da evolução das lesões já existentes. Nas fases de maturação os frutos voltam a apresentar-se novamente susceptíveis (Fig. 2) (Muller, 1964, 1980; Várzea *et al.*, 2002b).

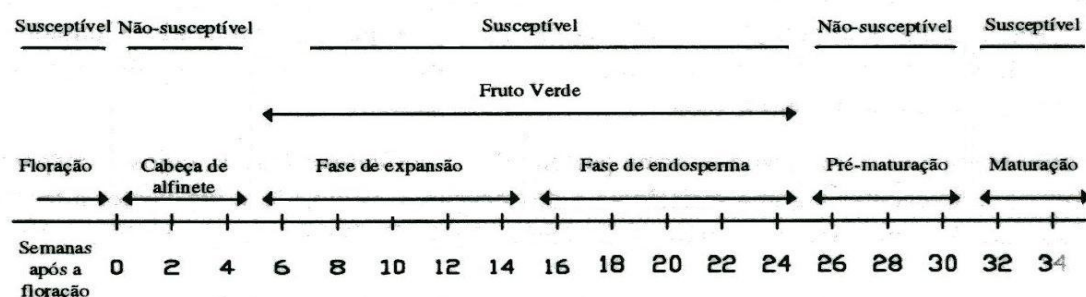


Fig. 2 - Crescimento e desenvolvimento dos frutos, mostrando os estados resistentes e susceptíveis a *Colletotrichum kahawae* (adaptado de Macedo, 1994).

2.3.3 - Ciclo da doença

A infecção é iniciada por meio dos conídios, que são produzidos nos acérvulos, encontrando-se na casca dos ramos e nos frutos mumificados formados na época produtiva anterior (Firman & Waller, 1977). De acordo com Gibbs (1969), os frutos infectados são a principal fonte de inóculo. Embora os conídios provenientes da casca dos ramos possam dar origem à doença, a progressão desta está mais dependente do inóculo dos frutos. Para que ocorra a germinação dos esporos, é necessário que a humidade relativa esteja muito próxima dos 100% e também a presença de uma película de água que se encontra geralmente à superfície das plantas, resultante da precipitação, neblina ou orvalho. A

germinação não ocorre, se não houver a presença dessa película de água mesmo que a humidade esteja muito próxima da saturação (Nutman & Roberts, 1960a, 1960b). A temperatura óptima para a germinação dos esporos de *C. kahawae* é de 22° C. A 17° C e a 28° C a germinação é cerca de 40% e abaixo de 10° C e acima de 30° C é de 0% (Nutman & Roberts, 1960b; Várzea *et al.*, 2002b).

Assim, os conídios de *C. kahawae* ao germinarem formarão tubos germinativos e apressórios melanizados, a partir dos quais ocorre a penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro. Ao longo do processo de infecção (descrito mais pormenorizadamente no ponto 2.4.4) ocorre a formação de conídios em acérvulos, que ao romperem a cutícula libertam uma nova geração de esporos (Fig. 3) (Várzea *et al.*, 2002b; Silva *et al.*, 2006; Loureiro, 2008).

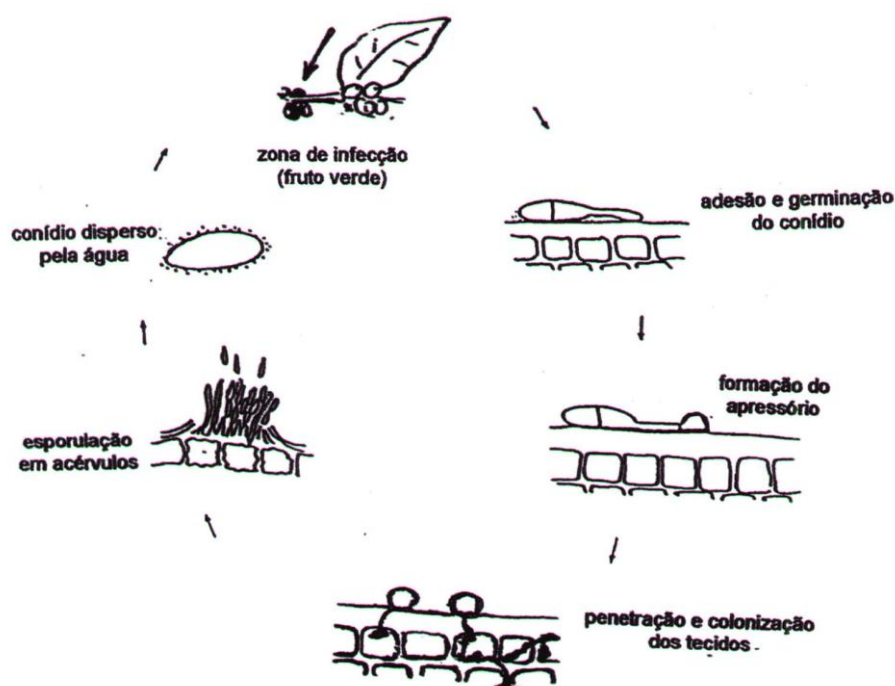


Fig. 3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de *Colletotrichum kahawae* (agente causal da antracnose dos frutos verdes do cafeeiro - adaptado de Jeffries & Koomen, 1992).

2.3.4 - Processo de infecção

O processo de infecção de *C. kahawae* começa com a germinação dos conídios, dando origem a um tubo germinativo onde se vão diferenciar na sua extremidade os apressórios melanizados. A penetração pode ocorrer em diferentes órgãos do cafeeiro (folhas e frutos verdes), directamente através das células da epiderme (Garcia 1999; Chen, 2002; Silva *et al.*, 2006; Loureiro, 2008). A hifa de infecção penetra no lúmen da célula do hospedeiro, formando uma vesícula de infecção. A susceptibilidade envolve a ramificação intra e

intercelular da vesícula de infecção nas células do hospedeiro. Este período em que o fungo se alimenta de células vivas (biotrofia) pode durar entre 48 a 72 h após a inoculação, dependendo do maior ou menor grau de agressividade do isolado utilizado, não sendo ainda visíveis sintomas macroscópicos (Várzea *et al.*, 1990, 2002b; Silva *et al.*, 2006). Após um período que envolve o crescimento das hifas em células vivas do hospedeiro (biotrofia), segue-se um período de crescimento necrotrófico (as células do hospedeiro já se encontram mortas). A necrotrofia está associada a intensas alterações da parede celular e à morte da célula hospedeira (Garcia, 1999; Silva *et al.*, 2006; Loureiro 2008). A fase biotrófica repete-se à medida que o fungo começa a colonização de novas células hospedeiras, sendo assim possível observar o crescimento das hifas simultaneamente em células vivas e mortas (Silva *et al.*, 2006). Segundo os trabalhos efectuados por Chen (2002) e Chen *et al.* (2004), em que se estudaram diversas enzimas que degradam as paredes das células (poligalacturonase, polimetilgalacturonase, pectina-líase, pectato-líase e carboximetilcelulase), a pectato-líase estará envolvida na patogenicidade de *C. kahawae*.

2.3.5 - Modo de dispersão dos conídios

Os salpicos das gotas de água das chuvas são um meio particularmente eficaz na disseminação da doença a curta distância, dentro de uma mesma planta ou entre plantas próximas, por reunirem as condições de humidade propícias à germinação imediata dos conídios, logo após o contacto com o hospedeiro, como também por protegerem os esporos da dessecação (Waller, 1972). Tanto a exsudação dos conídios em massas mucilaginosas como a desagregação destas com libertação dos conídios só se dá na presença de água líquida (Firman & Waller, 1977). A dispersão do CBD a média e longa distância depende, essencialmente, do Homem, quando realiza a colheita e transporte de frutos doentes, podendo os pássaros e outros animais que contactam os frutos maduros dos cafeeiros ser também vectores da doença (Firman & Waller, 1977).

2.3.6 - Fontes de inóculo

Segundo Nutman & Roberts (1960a, 1960b; 1961) a origem do ataque aos frutos verdes dever-se-ia ao inóculo presente na casca dos ramos. Estes autores elaboraram uma teoria onde o agente patogénico constituía, na casca dos ramos do cafeeiro, um potencial de inóculo que em determinado momento originaria inóculo capaz de infectar os frutos. Contudo Gibbs (1969) provou serem os frutos infectados, caídos no chão ou mumificados nas árvores, a principal fonte de inóculo para a frutificação seguinte. Os frutos deixados na árvore assumem um papel importante como fonte de inóculo primário, especialmente nas

zonas mais propícias à doença e naquelas onde por existirem duas estações chuvosas, coexistem duas produções (Gibbs, 1969).

Vermeullen (1970) fez uma importante contribuição para a clarificação da epidemiologia no CBD, ao concluir que *C. kahawae* estava restringido aos ramos mais jovens, representando uma pequena fracção da população de *Colletotrichum* spp. existente na casca dos ramos de cafeeiro. Na ausência dos frutos doentes, o inóculo proveniente das cascas dos ramos pode iniciar uma epidemia, sendo o subsequente progresso sobretudo dependente dos conídios formados nos novos frutos infectados (Griffiths *et al.*, 1971).

2.3.7 - Epidemiologia

Para avaliar a evolução desta doença, é importante realçar o papel da pluviosidade na produção, dispersão, germinação de esporos e no processo de infecção pelo agente patogénico. Para além disso, a sua influência na regulação da floração e no ciclo fenológico dos cafeeiros, contribui significativamente para o aparecimento de epidemias (Masaba & Waller, 1992).

Nos países situados junto ao Equador as precipitações distribuem-se por uma estação longa de chuvas (Março – Maio) e por uma estação curta (Outubro – Dezembro) espaçadas por períodos mais ou menos secos (Fig. 4a). Nessas condições ocorrem duas florações ao longo do ano (Masaba & Waller, 1992). No caso do Quénia, a primeira floração ocorre no princípio da estação longa das chuvas, enquanto o segundo período de chuvas normalmente induz uma segunda floração de menor importância. Deste modo, estão presentes em simultâneo, os frutos do ciclo anterior e os frutos no início de crescimento da cultura seguinte. A primeira produção, derivada da primeira floração, é atacada mais severamente por *C. kahawae*.

Os ataques de *C. kahawae* resultam da existência simultânea de frutos susceptíveis nos cafeeiros e da presença abundante de inóculo, o qual provém de frutos formados fora da época e que se encontram infectados, de frutos mumificados e ainda da casca dos ramos (Fig. 4b) (Várzea, 1990). Esta fonte constante de inóculo exige a aplicação de fungicidas durante quase todo o ano (Masaba & Waller, 1992).

Os países que estão mais afastados do Equador (como é caso dos Camarões, Malawi e Zimbabué) têm apenas uma estação chuvosa, resultando somente numa colheita.

Recentemente, estudos efectuados nos Camarões verificaram que a pluviosidade era um dos factores chave no desenvolvimento de CBD, em cafeeiro Arabica (Bedimo *et al.*, 2010).

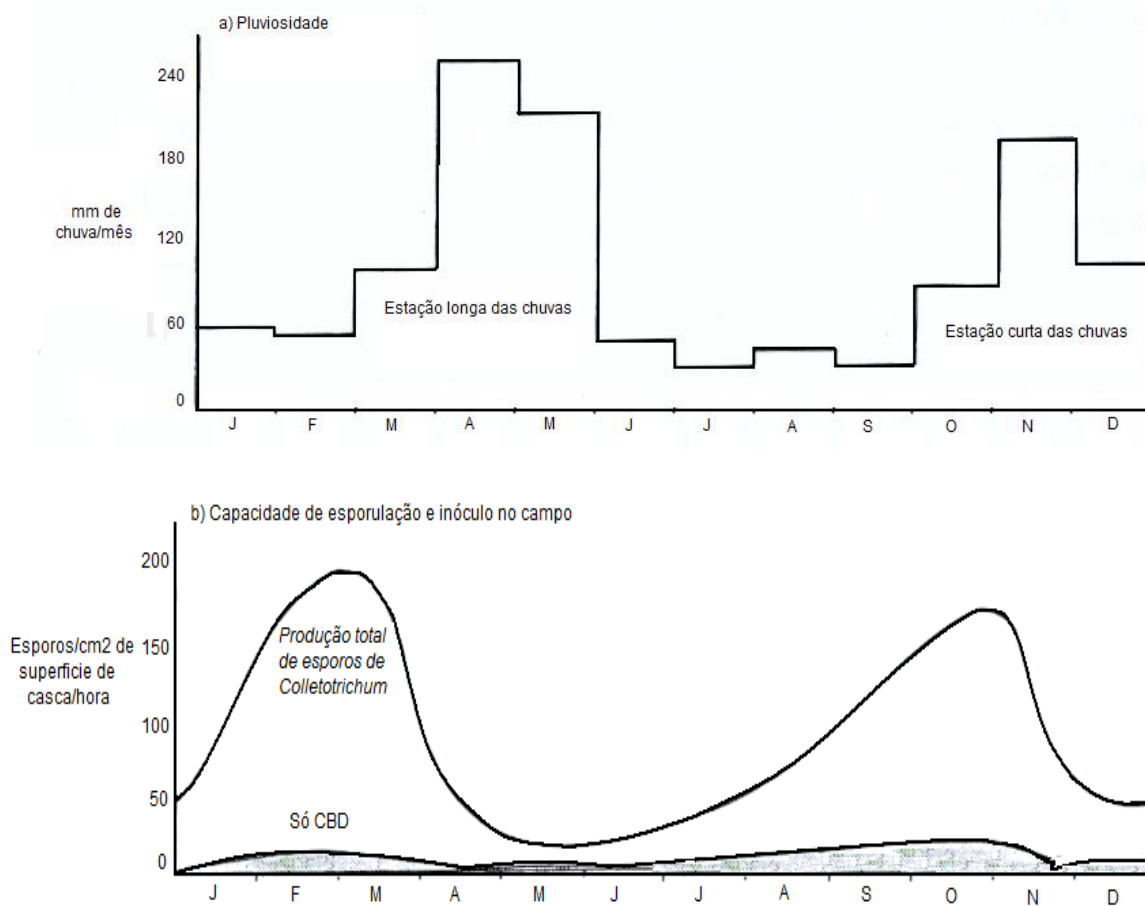


Fig. 4 - Diagramas representando os principais factores com influência na epidemia do CBD. a) Precipitação média mensal de 20 locais diferentes durante um período de 18 anos na zona oriental de Rift, Quênia (adaptado de Várzea, 1990). b) Capacidade de esporulação de *Colletotrichum* na casca de ramos frutíferos (adaptado de Várzea, 1990).

2.3.8 - Efeito da altitude e da sombra

A presença de *C. kahawae* nos cafezais varia com a altitude. A baixa altitude, as temperaturas máximas normalmente demasiado elevadas, atingindo 30° C, e a humidade relativa baixa, cerca de 50%, dificulta a infecção dos frutos verdes (Nutman & Roberts, 1960a, 1960b). Para as regiões onde a altitude é mais elevada as temperaturas prevalecem entre 17 e 28° C durante longos períodos, criando-se as condições climáticas adequadas ao desenvolvimento da infecção (Nutman & Roberts, 1960a, 1960b). Porém, segundo Muller (1980), a temperatura é o elemento que em regra melhor distingue as regiões de diferente altitude, exercendo uma acção mais directa sobre o hospedeiro que sobre o agente patogénico. A menor incidência da doença nas zonas de baixa altitude resulta, ainda de um rápido crescimento dos frutos que reduz a duração da fase de susceptibilidade. Mulinge (1971) defendeu que as condições climáticas de baixa altitude actuariam negativamente na proporção do CBD na microflora da casca, em comparação com as outras espécies não patogénicas.

Dependendo da altitude, a sombra pode provocar um efeito positivo ou negativo sobre o desenvolvimento da doença. A altitudes elevadas, o efeito de sombra reduz o período de tempo com temperaturas ótimas em que a invasão pode ocorrer. Pelo contrário, a baixas altitudes a sombra reduz as temperaturas elevadas, prolongando os períodos favoráveis à ocorrência de infecção (Nutman & Roberts, 1960a, 1960b).

2.3.9 - Meios de Luta

A antracnose dos frutos verdes do cafeeiro, é controlada essencialmente pela aplicação de fungicidas. Para além da luta química, determinadas medidas culturais e utilização de variedades resistentes são utilizadas para o controlo desta doença.

2.3.9.1 - Luta química

O controlo do CBD por meio de pulverizações com fungicidas, na época das chuvas, tem sido bastante estudado no Quênia. Foram estabelecidos programas de pulverizações que ainda hoje são recomendados, para o controlo da doença tanto neste país como noutros (Griffiths *et al.*, 1971; Várzea *et al.*, 2002b). Até 1969 apenas os fungicidas cúpricos eram usados no Quênia e noutros países, não só pelo seu baixo custo, mas também por combater um grande número de doenças do cafeeiro. Após 1969 surgiram novos fungicidas, como o captafol, clorotalonil, ditianão, carbendazime e benomil (Griffiths *et al.*, 1971). Porém, os fungicidas sistémicos do grupo dos benzimidazóis (por exemplo benomil e o carbendazime) embora referenciados como bastante eficazes, especialmente em estados avançados da epidemia, deixaram de ser recomendados. Para além do fungo ter desenvolvido resistência a estes produtos, em certos países, havia um aumento da intensidade da doença quando estes fungicidas eram aplicados (provavelmente devido à destruição da microflora auxiliar) (Masaba & Waller, 1992; Várzea *et al.*, 2002b). Por outro lado, o captafol, que garantia bons resultados, sobretudo devido à sua persistência durante as épocas chuvosas foi retirado do mercado, devido aos seus possíveis efeitos carcinogénicos (Masaba & Waller, 1992).

Por vezes, os programas de aplicação de fungicidas, não são muito eficazes na prevenção do CBD, principalmente em altitudes elevadas e em anos de excessiva precipitação tornando-se muito dispendiosos e revelando a necessidade de outros métodos de controlo (Várzea *et al.*, 2002b).

2.3.9.2 - Luta cultural

A realização de algumas práticas culturais, juntamente com outras medidas, pode reduzir os níveis de incidência desta doença (Bedimo *et al.*, 2008).

A colheita fitossanitária ou “colheita profiláctica” é das práticas culturais mais importantes para reduzir a quantidade de inóculo disponível e, conseqüentemente, a incidência da doença. No início do aparecimento da doença, esta consiste na remoção dos frutos intersazonais e daqueles não colhidos na época apropriada. Os frutos atacados que caem para o chão e os que ficam mumificados na árvore, são uma importante fonte de inóculo pelo que devem ser removidos (Muller, 1980; 1982).

A alteração da época de floração, de maneira a que as fases de desenvolvimento do fruto não coincidam com as condições climáticas mais propícias ao desenvolvimento da doença, recorrendo à rega antes das chuvas, ou a utilização de variedades de cafeeiro onde a maturação dos frutos é mais precoce, foi um método estudado por Muller (1980) nos Camarões, país onde a floração se concentra numa única época. Nos ensaios efectuados por este investigador, normalmente é feita uma rega para induzir a floração 5 a 6 meses antes da época das chuvas. Com esta dissociação entre o ciclo fenológico do cafeeiro e o regime pluviométrico é modificada a relação parasita-hospedeiro e as infecções podem diminuir ou ser evitadas (Muller, 1973).

A diminuição ou o aumento da sombra, respectivamente, a altas e baixas altitudes, pode limitar, em parte, a propagação da doença, como já foi referido anteriormente (Nutman & Roberts, 1960a; Várzea *et al.*, 2002b).

O sistema de poda em um só caule reduz a floração, fora da estação principal e uma copa aberta sem folhas excessivas facilita a aplicação de fungicidas no combate ao CBD (Várzea, 1990).

2.3.9.3 - Luta biológica

Segundo Wilson (1997), este meio de luta consiste em controlar a doença, através de microrganismos antagonistas ou de produtos biológicos libertados por esses microrganismos.

Os inconvenientes relacionados com a aplicação de fungicidas, o longo tempo necessário para a obtenção e divulgação de variedades resistentes, justificaram a procura de métodos alternativos no combate à doença, nomeadamente através da luta biológica.

Masaba (1991) estudou o papel da microflora saprofítica do cafeeiro e observou que fungos filamentosos, como *Fusarium stilboides* Wollenw., *Cladosporium tenuissimum* Cooke e

Penicillium glabrum Wehmen, conseguiram inibir o processo de infecção desencadeado por *C. kahawae* em frutos destacados e hipocótilos.

Pedro (1996) obteve uma forte acção antagonista entre *Bacillus subtilis* Cohn e isolados de *C. kahawae*, verificando que com esta interacção seria possível controlar significativamente a antracnose, em frutos destacados e em hipocótilos, em condições laboratoriais. Pedro *et al.* (2004) verificaram que o tratamento dos frutos verdes, antes ou imediatamente após a inoculação, com suspensões de *Bacillus subtilis*, reduziu fortemente a germinação dos conídios, formação dos apressórios, crescimento micelial e o número de lesões nos frutos. Referem que os compostos antagonistas parecem ser de natureza peptídica.

Guerra-Guimarães *et al.* (2006) estudaram o efeito que o fungo *Epicoccum nigrum* Link poderia ter sobre os isolados de *C. kahawae*. Foi observado um efeito antagonista onde se registou uma ligeira redução no crescimento micelial, na germinação de conídios e na formação de apressórios de *C. kahawae* em frutos verdes destacados. Foi testada a eficácia de *E. nigrum* no campo, este revelou actuar como agente de controlo da doença, quando comparado com os fungicidas à base de cobre.

2.3.9.4 - Medidas de quarentena

A rápida dispersão da ferrugem alaranjada do cafeeiro na América Latina em 1970, veio alertar para o perigo da disseminação de outras doenças, como é o caso do CBD, ainda que esta doença esteja actualmente limitada ao continente africano. Devem assim, ser tomadas precauções em relação ao material vegetal proveniente de países onde possa existir a doença (Wrigley, 1988; Silva *et al.*, 2006).

2.3.9.5 - Luta genética

O desenvolvimento de variedades que combinam produções elevadas, qualidade e resistência ao CBD, contribuíram para o aumento sustentável da produção de café Arabica no continente africano. Numa tentativa de minimizar os custos e as dificuldades associados ao combate de CBD, alguns centros de melhoramento genético do cafeeiro têm desenvolvido esforços no sentido de obter variedades resistentes a esta doença. Algumas destas variedades, começaram a ser desenvolvidas no Quênia, Etiópia e Tanzânia (van der Vossen & Walyaro, 2009). Por outro lado, algumas variedades de *C. arabica* têm sido apontadas como apresentando um certo grau de resistência ao CBD: Geisha, Boma Plateu, Blue Mountain, Pretória, K7, Mundo Novo, 43-7x R.P.13, Sumatra, Rume Sudan, Guatemala, Columnaris, Barbuck Suda, Babbakka Ghimira, Padang, Gimma Galla, Sidamo e Moca (Rayner, 1952; Firman, 1964; da Ponte, 1965; Griffiths, 1968; van der Vossen,

1977). Diferentes níveis de resistência a *C. kahawae*, também foram encontrados em alguns híbridos interespecíficos tetraplóides, nomeadamente o Híbrido de Timor (HDT), Icatú e Ruiru 11 (estes últimos produzidos, respectivamente no Brasil e Quênia, possuindo também resistência à ferrugem alaranjada) (Carvalho & Mónaco, 1976; van der Vossen, 1977; Walyaro, 1983; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Na Zâmbia, uma linha pura da variedade Colômbia (derivada de HDT), exibe um elevado nível de resistência quando comparada com a variedade Catuaí ou Caturra. No Quênia, a variedade Ruiru 11 tem revelado bons resultados na resistência ao CBD (Silva *et al.*, 2006).

2.3.10 - Hereditariedade da resistência a *C. kahawae* em *Coffea* spp.

Segundo Silva *et al.* (2006), a resistência ao CBD parece ser completa para *C. canephora* e parcial para *C. arabica*.

Estudos efectuados no Quênia (van der Vossen & Walyaro, 1980, 1981) e recentes ensaios com recurso a técnicas moleculares (Omondi & Pinard, 2006; Gichuru *et al.*, 2008) concluíram que a resistência dos cafeeiros de Arabica à antracnose dos frutos verdes é condicionada por alguns genes maiores, com diferente acção em três *loci* diferentes R, T, K. Na variedade Rume Sudan, muito resistente ao CBD, os genes R e K são respectivamente dominantes e recessivos. As variedades K7 e Blue Mountain, apresentam resistência moderada que está associada ao gene recessivo K. Em HDT (resultante da hibridação interespecífica natural entre *C. arabica* e *C. canephora*) existe, por sua vez, um gene no locus T de acção intermédia (van der Vossen & Walyaro, 1981).

Contudo, ainda não se verificou um consenso relativamente à resistência genética ao CBD. Enquanto alguns autores afirmam que esta é de carácter oligogénica (controlada por um ou poucos genes) outros defendem que a resistência é poligénica (conferida por muitos genes) (van der Vossen & Walyaro, 2009).

2.3.11 - Mecanismos de resistência do cafeeiro a *C. kahawae*

As defesas da planta aos agentes patogénicos podem ser constitutivas ou pré-existentes, tais como as características estruturais (ceras, topografia da folha, existência de pêlos) que impedem a entrada dos microrganismos, a presença de determinado composto antimicrobiano ou, ainda a falta de determinado receptor, sinal ou nutriente necessário para o estabelecimento da patogenicidade (Ride, 1985; Meeley *et al.*, 1992; Esele *et al.*, 1993; Heath, 1997; Veneault-Fourrey *et al.*, 2005).

Outras defesas são induzidas após a infecção, como alterações estruturais ao nível da parede celular, síntese e acumulação de fitoalexinas (compostos anti-microbianos de baixo

molecular), a formação de *papillas* (deposição de compostos entre o plasmalema e a parede das células do hospedeiro no local de infecção e penetração) e a reacção de hipersensibilidade – RH (morte rápida localizada de uma ou mais células da planta hospedeira no local de infecção e penetração do agente patogénico) (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992; Skipp *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004; Torregrosa *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2006).

Nos cafeeiros Arabica, de acordo com Gichuru (1997), os mecanismos de resistência a *C. kahawae* são constitutivos e induzidos e operam em diferentes fases da interacção. A cutícula dos frutos do cafeeiro pode actuar como uma barreira física à penetração dos agentes patogénicos. As experiências efectuadas por Nutman & Roberts (1960a) revelaram que a remoção da epiderme dos frutos verdes de cafeeiro, em comparação com os frutos não feridos, transforma variedades resistentes, como a Blue Mountain e Kent, em susceptíveis. Outros trabalhos efectuados, revelaram que a extracção de ceras da cutícula de frutos verdes de certas variedades de cafeeiro resistentes (como Blue Mountain e Rume Sudan), origina compostos que inibem a germinação dos conídios e podem contribuir para os elevados níveis de resistência em campo destas variedades (Steiner, 1972; Lampard & Carter, 1973). Também Masaba & Helderman (1985) descobriram que, em hipocótilos de Rume Sudan e SL 28, dois dias após a inoculação, foram produzidos compostos que inibem a germinação dos conídios e o crescimento micelial de *C. kahawae*. Mais recentemente, Chen *et al.* (2006) mostraram que o tratamento dos frutos verdes do cafeeiro com epicatequina (presença abundante no pericarpo dos frutos verdes do cafeeiro) ou catequina inibe a melanização dos apressórios de *C. kahawae* e de *C. gloeosporioides* reduzindo significativamente a percentagem de infecção.

De acordo com Masaba & van der Vossen (1982), a resistência ao CBD, em frutos ligados à planta e hipocótilos de cafeeiros Arabica, estaria associada à formação de barreiras de suberina, abaixo do local de infecção, constituindo estas, uma barreira mecânica que impedia o desenvolvimento do fungo nos tecidos do hospedeiro. Estas formações correspondem macroscopicamente à lesão tipo *scab* característica da resistência (Gichuru, 1997). Estas barreiras não existiam ou estavam pouco desenvolvidas nas variedades susceptíveis. Verificou-se também que os frutos verdes destacados de variedades resistentes, não têm capacidade para desenvolver camadas de células suberificadas, abaixo do local de infecção. Aparentemente, este tipo de mecanismo parece depender da actividade metabólica do tecido da planta, uma vez que os frutos verdes destacados perdem rapidamente a capacidade de responder à infecção causada pelo fungo (Masaba & van der Vossen, 1982; Masaba & Waller, 1992). A formação desta barreira depende da temperatura (Masaba, 1982). A maior diferença na formação deste tipo de barreira, em variedades resistentes e susceptíveis, verificou-se entre 19° C e 22° C. Por

outro lado, temperaturas abaixo de 16° C e acima de 28° C reduzem a formação de barreiras. Este tipo de mecanismo de resistência é considerado estável e referido como não específico (Masaba & van der Vossen, 1982). Estudos histológicos efectuados no CIFC em derivados do Híbrido de Timor (HDT), com resistência a um isolado do Malawi (Mal2), comparativamente com a variedade susceptível Caturra, não revelaram diferenças na germinação e diferenciação de apressórios melanizados. Contudo, verificou-se que nos genótipos resistentes, o fungo apresentou um crescimento restrito no interior do tecido do hospedeiro, associado às seguintes respostas da planta: i) reacção de hipersensibilidade, ii) modificações nas paredes celulares (espessamento e autofluorescência) e iii) rápida acumulação de compostos fenólicos, nomeadamente derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (Silva *et al.*, 2006; Loureiro *et al.* 2008). Os mesmos padrões de resposta, foram observados em hipocótilos resistentes de *C. racemosa*. Noutros genótipos resistentes derivados de HDT foi detectada a rápida acumulação de calose, em torno das hifas intracelulares das células da epiderme e também de células do córtex (Silva *et al.*, 2006).

3 - Caracterização da resistência a *Colletotrichum kahawae* em diferentes genótipos de cafeeiro

Desde 1989 têm sido testados no CIFC centenas de milhares de cafeeiros com diferentes isolados de *C. kahawae* de várias regiões africanas, por meio do *pre-screening test* (método do hipocótilo) desenvolvido por van der Vossen *et al.* (1976), no Quênia. Estes autores, trabalhando com isolados de *C. kahawae* locais e diferentes genótipos de cafeeiro encontraram uma correlação de 0,76 entre o teste do hipocótilo e a doença no campo.

Os trabalhos levados a cabo no CIFC, com a utilização de isolados de diferentes áreas geográficas africanas, têm permitido seleccionar centenas de cafeeiros com diferentes espectros de resistência. Alguns destes cafeeiros encontram-se em observação de campo, em regiões africanas, onde existe a doença.

3.1 - Material e métodos

3.1.1 - Material biológico

No presente estudo foram utilizados sete isolados monospóricos de *C. kahawae*, da colecção do CIFC (Quadro 1).

Quadro 1 - Isolados de *Colletotrichum kahawae* utilizados no presente estudo, sua designação, ano de entrada no CIFC e origem geográfica.

Designação	Ano	Origem
Cam1	1992	Camarões
Que2	1989	Quênia
Zim1	1991	Zimbabué
Tan3	2006	Tanzânia
Eti10	1993	Etiópia
Eti20	1993	Etiópia
Ang31	2005	Angola

Utilizaram-se ao todo 46 genótipos de cafeeiros, 39 genótipos da colecção do CIFC provenientes de Timor, Costa Rica e Brasil e 7 genótipos de cafeeiros disponibilizados pelo Central Coffee Research Institute (CCRI), Índia, especificamente para este trabalho (Quadro 2).

Quadro 2 - Genótipos de cafeeiros da colecção do CIFC utilizados no presente estudo, designação e sua origem geográfica.

Genótipos (CIFC)	Designação (CIFC)	Origem Geográfica
832/2	HDT	Timor
7963	Catimor 45	CIFC, Portugal
12859/3	Sarchimor T.5296	Costa Rica
12859/5	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13478/2	<i>C. arabica</i> Villa Sarchi	IAC, Brasil
13483/1	Sarchimor C.1669-31	Costa Rica
13483/2	Sarchimor C.1669-31	Costa Rica
13485/2	Sarchimor C.1669-13	Costa Rica
13682/6	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/8	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/9	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/10	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/12	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/33	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/36	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/40	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/41	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13682/42	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/17	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/18	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/21	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/23	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/25	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/26	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/35	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/40	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13683/42	Sarchimor T.5296	Costa Rica
13687/17	Caturra x Catimor T.5298	Costa Rica
13726/2	Cavimor T.5036	Costa Rica
13726/17	Cavimor T.5036	Costa Rica
13726/20	Cavimor T.5036	Costa Rica
13726/25	Cavimor T.5036	Costa Rica
13727/18	Cavimor T.5036	Costa Rica
14412/6	Sarchimor 756163-12-10	IAPAR, Brasil
18863/22	Sarchimor 1669	IAC, Brasil
18863/43	Sarchimor 1669	IAC, Brasil
18863/61	Sarchimor 1669	IAC, Brasil
18863/112	Sarchimor 1669	IAC, Brasil
18863/314	Sarchimor 1669	IAC, Brasil
S.795	[(<i>C. arabica</i> x <i>C. liberica</i>) x <i>C. arabica</i>]	CCRI, Índia
SIn 11	(<i>C. liberica</i> x <i>C. eugenoides</i>)	CCRI, Índia
21193	S.795 7/7	CCRI, Índia
21194	S.795 26/1	CCRI, Índia
21195	S.795 52/1	CCRI, Índia
21196	S.795 57/1	CCRI, Índia
21197	S.795 58/1	CCRI, Índia

3.1.2 - Métodos

3.1.2.1 - Obtenção do inóculo

Os isolados de *C. kahawae* utilizados, eram provenientes da colecção existente no CIFC. Cada isolado foi repicado para uma placa de Petri contendo Gelose de Extracto de Malte (MEA) das marcas comerciais *Oxoid* e *Cultimed* a 3,4%. Os crescimentos decorreram a 22° C no escuro. Cerca de 8 a 10 dias após a inoculação, colocou-se cerca de 10 mL de água destilada esterilizada e com uma agulha entomológica curva fez-se uma lavagem de esporos. Filtrou-se toda a suspensão através de gaze, para obtenção apenas de conídios. A concentração dos esporos foi determinada com ajuda de um hemacitómetro ou câmara de *Neubauer*, procedendo-se depois à sua quantificação e acerto da suspensão de modo a obter cerca de 2×10^6 conídios/mL, destinando-se à inoculação por gota ou por pulverização.

3.1.2.2 - Inoculação em frutos verdes destacados

Frutos verdes destacados da variedade Catimor 45 e dos genótipos 13478/2, 13682/8, 13682/12, 13682/36, 13682/40, 13682/42, 13683/21, 13683/25, 13683/26, 13683/42, 13687/17 e 13726/25 foram inoculados segundo a técnica descrita por van der Vossen *et al.* (1976). Os frutos após serem lavados foram dispostos sobre esponjas de *nylon* humedecidas, com água da torneira, e colocadas dentro de tabuleiros de plástico. Cada fruto foi inoculado com uma gota de 5 µL de suspensão de conídios de *C. kahawae*, com concentração aproximada de 2×10^6 conídios/mL de água destilada. Por sua vez, os tabuleiros foram envolvidos em sacos de plástico também humedecidos, funcionando o conjunto como câmara húmida, e colocados numa câmara de crescimento com temperatura de 22° C e um fotoperíodo de 12 h, excepto nas primeiras 24 h onde foram mantidos no escuro. A variedade Catimor 45 foi inoculada com todos os isolados em estudo (Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti10, Eti20 e Ang31) enquanto os restantes genótipos foram inoculados apenas com os isolados Cam1 e Que2.

Testaram-se cerca de 50 frutos verdes por cada isolado testado por cada genótipo, tendo sido efectuadas três repetições. Foram feitas observações diárias dos sintomas e cerca de dez dias após a inoculação registou-se o diâmetro médio das lesões (mm) e a Frequência de Infecção (FI) que se traduziu na percentagem de frutos inoculados com sintomas.

3.1.2.3 - Inoculação em hipocótilos

Seguiu-se a metodologia descrita por van der Vossen *et al.* (1976), com ligeiras modificações. Hipocótilos de 3 a 6 cm de comprimento (aproximadamente com 5-6 semanas após a sementeira) depois de retirados das semeadeiras e bem lavados foram colocados

sobre esponjas de *nylon* humedecidas com água, dentro de tabuleiros de plástico, e inoculados com uma suspensão de conídios (2×10^6 conídios/mL) por meio de um pequeno atomizador acoplado a uma bomba de pressão de ar (*Pumpentyp Siehe unterseite Pumpe VDE 0530*). Após um período de incubação de 48 h, os hipocótilos foram re-inoculados pelo mesmo processo. Os tabuleiros foram envolvidos em sacos de plástico humedecidos, com água e colocados numa câmara de crescimento com temperatura de 22° C durante 24 h no escuro. Foram de seguida colocados a uma temperatura de 19° C com um fotoperíodo de 12 h, onde permaneceram durante todo o período em que decorreu o ensaio. Fizeram-se observações de 2 em 2 dias durante cerca de 23 dias após a inoculação. A avaliação dos sintomas foi feita de acordo com a escala descrita por van der Graaff (1981) (Quadro 3).

Quadro 3 - Escala de classificação utilizada em testes de inoculação em hipocótilos (adaptada de van der Graaff, 1981).

Tipo de reacção	Descrição
1	Ausência de sintomas
2	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas (equivalente a lesões tipo sarna ou <i>scab</i>) ou acastanhadas
3	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro das lesões excede 0,5 mm. Pontos negros, quando presentes são raros
4	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos negros e/ou lesões negras. As lesões negras podem rodear completamente o hipocótilo mas a parte terminal deste permanece viva
5	Hipocótilo morto

Com base nesta escala de classificação e com as leituras dos sintomas efectuadas 23 dias após a inoculação construiu-se o Índice de Agressividade dos isolados (IA) e as Classes de Resistência (CR) dos genótipos de cafeeiros.

Índice de Agressividade (IA) dos isolados

$$(IA) = \sum (\text{n}^\circ \text{ de hipocótilos em cada classe} \times \text{valor numérico de cada classe}) / (\text{N}^\circ \text{ total de hipocótilos em todas as classes} \times 5)$$

Consoante os valores obtidos para o IA, os isolados de *C. kahawae* testados foram classificados nas seguintes classes de agressividade (CA): Baixa Agressividade (1): $0 < IA \leq 0,25$; Média Agressividade (2): $0,25 < IA \leq 0,50$; Alta Agressividade (3): $0,50 < IA \leq 0,75$; Muito Alta Agressividade (4): $IA > 0,75$.

Classes de Resistência (CR) dos genótipos de cafeeiros

Foram criadas as seguintes classes de resistência (CR): Susceptível (S): $0 < HR \leq 25\%$; Moderadamente Susceptível (MS): $25\% < HR \leq 50\%$; Moderadamente Resistente (MR): $50\% < HR \leq 75\%$ e Resistente (R): $> 75\%$, de acordo com a seguinte fórmula:

% Hipocótilos Resistentes (HR) = $[\text{n}^\circ \text{ hipocótilos resistentes (reacção 1-4)} / (\text{n}^\circ \text{ total de hipocótilos testados})] \times 100$

3.1.2.4 - Estudos histológicos

Germinação de conídios e formação de apressórios *in vivo*

A determinação das percentagens de conídios germinados e de apressórios formados em frutos e hipocótilos foi efectuada de acordo com a técnica descrita por Silva *et al.* (1985). Para cada genótipo de cafeeiro inoculado, escolheram-se aleatoriamente três hipocótilos e/ou três frutos inoculados, de acordo com os tempos de inoculação definidos. De seguida deixou-se secar a gota de suspensão de esporos e pincelou-se a zona da gota com verniz de unhas transparente. Aproximadamente 7 horas mais tarde, o verniz foi destacado com uma pinça, funcionando como molde da superfície dos órgãos inoculados. Os moldes de verniz foram corados e montados numa mistura de azul de algodão em lactofenol¹ (cora as estruturas do fungo de azul). A determinação da percentagem de conídios germinados e de formação de apressórios melanizados e não melanizados, baseou-se na contagem de um mínimo de 6 conjuntos de 100 conídios por ensaio. Foi ainda calculada a percentagem de apressórios melanizados, relativamente ao total de apressórios (melanizados e não melanizados).

No caso dos frutos, esta avaliação foi efectuada para as 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 h após a inoculação (h.a.i.) e para os hipocótilos, o mesmo estudo foi efectuado às 15 h.a.i.

Processo de infecção do fungo

Para avaliar o processo de colonização do fungo seccionaram-se, com um micrótomo de congelação (*Leica, modelo CM1850*), fragmentos de hipocótilos inoculados. Os cortes (com uma espessura de 20 - 30 μm) foram depois corados e montados numa mistura clara de azul de algodão em lactofenol. Acompanhou-se o evoluir da infecção no interior dos tecidos 15, 24, 48 e 72 h após a inoculação, em cada zona de infecção, através da medição do comprimento das hifas com uma ocular micrométrica. Foram realizadas pelo menos duas experiências e para cada tempo de inoculação, foram feitas 4 repetições de 20 zonas de infecção.

¹ Lactofenol – Fenol: Ácido láctico:Glicerina (1:1:1)

Respostas celulares dos cafeeiros

De forma a estudar as respostas celulares da planta induzidas pelo processo de infecção de *C. kahawae* foram utilizados dois testes:

- **Teste de epifluorescência:** cortes transversais de fragmentos de hipocótilos infectados (15, 24, 48 e 72 h.a.i.) efectuados com um micrótomo de congelação, foram colocados numa solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 0,07M, pH 8,9 e posteriormente, montados na mesma solução e observados ao microscópio (Silva, 1990; Silva *et al.*, 2002). A autofluorescência das paredes celulares, foi usada como indicador da acumulação de compostos fenólicos (Bennett *et al.*, 1996).

- **Teste de fluorescência com azul de anilina:** cortes transversais de fragmentos de hipocótilos infectados (15, 24, 48 e 72 h.a.i.), efectuados com um micrótomo de congelação, foram colocados numa solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 0,07M, pH 8,9 e em seguida mantidos durante 5-10 min na mesma solução com 0,01% de azul de anilina (BDH, Inglaterra) na qual foram montados (Rijo & Vasconcelos, 1984; Loureiro, 2008). Os depósitos de calose foram identificados pela sua fluorescência amarelo brilhante (Eschrich & Currier, 1964).

Todas as observações foram efectuadas num microscópio *Leitz Dialux 20*, equipado com lâmpada de mercúrio HB0 100w, luz UV (excitação 340-380, filtro barreira 430) e luz azul (excitação 450-490, filtro barreira 515).

3.1.2.5 - Análise estatística

Os dados relativos ao diâmetro médio das lesões nos frutos verdes, foram tratados estatisticamente através da análise do teste de comparação múltipla de Tuckey e pelo teste *t* de Student. Os dados relativos à percentagem de conídios germinados e de apressórios formados, bem como o comprimento das hifas no interior dos hipocótilos foram submetidos ao teste *t* de Student e/ou análise de variância. Para a comparação das médias usou-se o teste da mínima diferença significativa (MDS) de Fisher. Para os valores expressos em percentagem foi usada a transformação $\text{arc.sen}\sqrt{\%}$. A análise estatística foi realizada com o programa *Statistica 6.0* (StatSoft Inc.).

3.2 - Resultados e discussão

Muitos dos resultados, obtidos nos ensaios relacionados com a caracterização da resistência foram colocadas no Anexo I, II e III para não dificultar a leitura e compreensão do texto. Sempre que necessário estes resultados, foram referidos no texto de forma simples ou trabalhada.

Para uma melhor compreensão dos assuntos estudados optou-se por iniciar a apresentação dos resultados com a caracterização da patogenicidade dos isolados de *C. kahawae* utilizados neste estudo.

3.2.1 - Caracterização da patogenicidade de isolados de *C. kahawae*

A variação genética no agente patogénico pode expressar-se em diferente agressividade ou em diferente virulência, definida por van der Plank, 1984. Quando isolados do agente patogénico apresentam interacção diferencial com variedades do hospedeiro diz-se que variam em virulência e quando não apresentam interacção diferencial com variedades do hospedeiro diz-se que variam em agressividade. A virulência é medida qualitativamente, enquanto a agressividade é avaliada quantitativamente.

Em *C. kahawae* tem sido encontrada variação na agressividade de isolados de diferentes regiões geográficas (Rodrigues *et al.*, 1992; Várzea, 1995; Loureiro 2008). Nos testes de rotina, realizados no CIFC, para caracterização da resistência do cafeeiro têm sido usados isolados de *C. kahawae* com diferentes níveis de agressividade (Várzea, 1995). No presente trabalho foi feita a caracterização da agressividade de dois dos isolados mais usados (Cam1 e Que2) no CIFC, bem como de outros isolados que nunca foram utilizados nesses testes, tais como Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31. Realizaram-se testes em hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro (cerca de 43 genótipos diferentes) tendo sido criado o Índice de Agressividade (§ 3.1.2.3) para classificar os diferentes isolados. Por outro lado, estes isolados foram também inoculados em frutos verdes destacados da variedade Catimor 45 tendo sido registado os seguintes parâmetros de agressividade (Várzea, 1995): a) diâmetro das lesões (mm) e b) Frequência de Infecção (FI) (percentagem de frutos inoculados com sintomas).

Pela observação do Quadro 4 verificou-se que todos os isolados testados mostraram agressividade muito alta (classe 4) quando inoculados em hipocótilos dos genótipos de cafeeiro 18863/22 e 18863/314 e da variedade Catimor 45 (utilizada como controlo susceptível nos testes de caracterização da resistência).

Quadro 4 - Classes de agressividade (1-4) dos isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de *Colletotrichum kahawae*, inoculados em hipocótilos, de cada genótipo de cafeeiro, 23 d.a.i.

Genótipos de cafeeiros	Isolados de <i>C. kahawae</i>						
	Cam1	Que2	Zim1	Tan3	Eti20	Eti10	Ang31
832/2	4 (6)	2 (6)					
12859/3	4 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)			
12859/5	4 (2)	3 (2)	2 (2)	3 (2)	3 (2)		
13478/2	4 (4,5)		4 (4)	4 (4)		4 (4)	4 (5)
13483/1	4 (8)	4 (9)	4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13483/2		4 (3)					
13485/2	4 (8)		4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13682/6	4 (8)	4 (10)	4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13682/8	4 (2,3)	2 (2,3)					
13682/9	4 (8)		4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13682/10	4 (8)	4 (9)	4 (8)	3 (8)	3 (8)	4 (8)	
13682/12	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)		
13682/33	4 (3)	3 (2,3)					
13682/36	4 (3,8)	3 (3)	4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13682/40	4 (2,3)	2 (2,3)					
13682/41	4 (2)	3 (2)	4 (2)	4 (2)			
13682/42	4 (2,3)	2 (2,3)					
13683/17	4 (2,8)	3 (2,9)	3 (2,8)	3 (2,8)		4 (8)	
13683/18	4 (2)	3 (2)	4 (2)	3 (2)			
13683/21	4 (3)	3 (3)		3 (3)			
13683/25	4 (2,8)	3 (2,9)	4 (3,8)	4 (8)		4 (8)	
13683/26	4 (3)	2 (3)					
13683/35	4 (2)	2 (2)	3 (2)	3 (2)			
13683/40	4 (8)	4 (9)	4 (8)	3 (8)		4 (8)	
13683/42	4 (4)						
13687/17	4 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	2 (2)	4 (2,8)	2 (2)
13726/17	4 (8)	4 (9)	4 (8)	4 (8)		4 (8)	
13726/20	4 (2,8,10)	3 (2,9,10)	3 (2,8,10)	2 (2)	3 (8,10)	4 (2,8)	3 (2)
13726/25	4 (3)	2 (3)		3 (5)			
13727/18	4 (8)	4 (9)	4 (8)	2 (8)	4 (8)	4 (8)	
14412/6	4 (8)	4 (9)	4 (8)	4 (8)		4 (8)	
18863/22	4 (8)	4 (9)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	
18863/43		4 (3)					
18863/61	4 (5,8)	3 (3)	4 (10)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	
18863/112		3 (2,3)					
18863/314	4 (8)	4 (9)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	
21148	4 (1)	4 (1)					
21149	4 (1)	4 (1)					
21193			4 (7)	4 (7)		4 (7)	
21194			4 (7)				
21195			4 (7)	4 (7)		4 (7)	
21196			4 (7)				
21197			4 (7)	4 (7)		4 (7)	
Catimor 45	4	4	4	4	4	4	4

O nº do Ensaio(s) encontra-se mencionado entre parêntesis por índice numérico a seguir à classe de agressividade. Baixa Agressividade (1): $IA \leq 0,25$; Média Agressividade (2): $0,25 < IA \leq 0,50$; Alta Agressividade (3): $0,50 < IA \leq 0,75$; Muito Alta Agressividade (4): $IA > 0,75$.

Os isolados Cam1 e Eti10 mostraram agressividade muito alta (classe 4) comparativamente com todos os outros isolados, quando inoculado em todos os genótipos de cafeeiros, enquanto os isolados Que2, Zim1, Eti20 e Ang31 mostraram agressividade alta (classe 3) e o isolado Tan3 apresentou agressividade média (classe 2).

Relativamente ao diâmetro médio das lesões na variedade Catimor 45 (Quadro 5), foi possível verificar que os isolados se encontram agrupados em 3 grupos: um grupo constituído apenas pelo isolado Ang31 que provocou lesões de menor dimensão (1,71 mm), um segundo grupo constituído pelos isolados Eti10, Que2, Zim1 e Tan3 que provocaram lesões com valores situados entre os 2,52 e 2,84 e um terceiro grupo formado pelos isolados Eti20 e Cam1 que provocaram lesões com maior diâmetro médio, respectivamente 4,86 mm e 5,32 mm.

Quadro 5 - Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados da variedade Catimor 45 (controlo susceptível), 10 dias após inoculação com os isolados Ang31, Eti10, Que2, Zim1, Tan3, Eti20 e Cam1 de *Colletotrichum kahawae*.

Isolados	Diâmetro médio das lesões (mm)
Ang31	1,71±0,67 a
Eti10	2,52±1,68 b
Que2	2,75±1,41 b
Zim1	2,81±1,33 b
Tan3	2,84±1,50 b
Eti20	4,86±1,65 c
Cam1	5,32±1,78 c

Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tuckey ($P \leq 0,05$); ($\bar{x} \pm DP$) média \pm desvio padrão.

No Quadro 6 é referida a FI definida neste trabalho, como percentagem de frutos inoculados com lesões. Os isolados Cam1 e Eti20 provocaram lesões em todos os frutos inoculados (FI=100%). O isolado Zim1 foi o que apresentou menor FI (FI=80%).

Quadro 6 - Frequência de infecção, em frutos verdes destacados de Catimor 45, 10 dias após inoculação com os isolados Zim1, Ang31, Eti10, Tan3, Que2, Eti20 e Cam1 de *Colletotrichum kahawae*.

Isolados	FI
	X \pm DP
Zim1	80 \pm 7 a
Ang31	83 \pm 1 ab
Eti10	83 \pm 5 ab
Tan3	88 \pm 4 ab
Que2	93 \pm 5 bc
Eti20	100 \pm 0 c
Cam1	100 \pm 0 c

FI = frequência de infecção (nº frutos infectados/nº total de frutos). Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tuckey ($P \leq 0,05$); ($x \pm DP$) média \pm desvio padrão.

De acordo com os resultados referidos nos Quadros 5 e 6 foi possível classificar os isolados Cam1 e Eti20 como exibindo maior nível de agressividade, devido às maiores dimensões das lesões exibidas, e maior Frequência de Infecção comparativamente com os outros isolados. De acordo com os mesmos parâmetros o isolado Ang31, foi o que mostrou menor nível de agressividade. No entanto, pela observação do Quadro 4 foi possível averiguar que o isolado Eti10 quando inoculado em hipocótilos, tem um comportamento de agressividade muito similar (classe 4) ao isolado Cam1. O isolado Eti10 quando inoculado em todos os genótipos de cafeeiro mostrou agressividade muito alta.

Para melhor caracterização da agressividade dos isolados Que2 e Cam1, foi determinada a percentagem de conídios germinados e de apressórios formados na variedade Catimor 45 (Quadros 7 e 8) assim como o diâmetro das lesões em diferentes genótipos de cafeeiro (Quadro 12).

Quadro 7 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) do isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae* em frutos verdes de Catimor 45, diferentes horas após a inoculação.

Horas após a inoculação	Estruturas do fungo		
	% Conídios germinados $x \pm DP$	% Apressórios * $x \pm DP$	% Apressórios melanizados $x \pm DP$
3	3±3 a	0 a	0 a
6	16±13 b	43±26 b	1±1 a
9	19±9 b	69±18 c	17±12 b
12	19±9 b	65±16 c	42±11 c
15	37±17 c	78±11 c	49±17 c
18	45±24 cd	88±14 d	72±20 d
24	51± 26 d	87±13d	69±18 d

* Considerou-se o total de apressórios, isto é, melanizados e não melanizados. Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de MDS de Fisher ($P \leq 0,05$); ($x \pm DP$) média \pm desvio padrão.

Quadro 8 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) do isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae* em frutos verdes de Catimor 45, diferentes horas após inoculação.

Horas após a inoculação	Estruturas do fungo		
	% Conídios germinados $x \pm DP$	% Apressórios * $x \pm DP$	% Apressórios melanizados $x \pm DP$
3	4±4 a	0a	0a
6	46±18 b	46±33 b	2±2 a
9	63±18 c	81±14 c	9±9 a
12	70±19 c	89±9 cd	42±31 b
15	88±7 d	92±6 d	56±26 b,c
18	90±6 d	94±6 d	71±23 c,d
24	90±8 d	94±5 d	72±30 d

* Considerou-se o total de apressórios, isto é, melanizados e não melanizados. Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de MDS de Fisher ($P \leq 0,05$); ($x \pm DP$) média \pm desvio padrão.

Para ambos os isolados, a germinação de conídios e a diferenciação de apressórios foram observados, respectivamente 3 h.a.i. e 6 h.a.i. A germinação dos conídios e a diferenciação de apressórios (melanizados e não melanizados) do isolado Que2 cessou a partir das 18 h.a.i. (os valores observados às 18 h.a.i. e 24 h.a.i. não se diferenciaram entre si) (Quadro 7). No caso do isolado Cam1 a germinação dos conídios cessou às 15 h.a.i. e a diferenciação de apressórios às 12 h.a.i (Quadro 8). Por sua vez a melanização de apressórios parece ter terminado cerca das 18 h.a.i., para ambos os isolados.

Quando se compararam, os dois isolados Cam1 e Que2 verificou-se que as percentagens de conídios germinados e de apressórios formados, foram significativamente superiores no isolado Cam1, respectivamente a partir das 6 h.a.i. e das 12 h.a.i (Quadros 9 e 10).

Quadro 9 - Percentagem de conídios germinados dos isolados Cam1 e Que2 de *Colletotrichum kahawae* em frutos verdes de Catimor 45, em diferentes horas após inoculação.

Horas após inoculação	Isolados		Teste t ^a
	Cam1	Que2	
3	4±4	3±3	0,15 ^{ns}
6	46±15	16±13	5,05 ^{***}
9	63±18	19±9	8,50 ^{***}
12	70±19	19±9	7,49 ^{***}
15	88±7	37±17	10,27 ^{***}
18	90±6	45±24	7,37 ^{***}
24	90±8	51±26	7,53 ^{***}

(x ± DP) média ± desvio padrão; ^a – Teste de t-Student; *** Significativamente diferentes (P≤0,001); ns – não significativo.

Quadro 10 - Percentagem de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelos isolados Cam1 e Que2 de *Colletotrichum kahawae* em frutos verdes de Catimor 45, diferentes horas após inoculação.

Horas após inoculação	Isolados		Teste t ^a
	Cam1	Que2	
3	0	0	0,18 ^{ns}
6	46±33	43±26	0,32 ^{ns}
9	81±14	69±18	2,05 ^{ns}
12	89±9	65±16	4,40 ^{***}
15	92±6	78±11	4,41 ^{***}
18	94±6	89±14	1,16 ^{ns}
24	94±5	87±13	2,66 ^{***}

(x ± DP) média ± desvio padrão; ^a – Teste de t-Student; *** Significativamente diferentes (P≤0,001); ns – não significativo.

Relativamente à percentagem de apressórios melanizados, não se registaram diferenças significativas entre os isolados Cam1 e Que2 (Quadro 11).

Quadro 11 - Percentagem de apressórios melanizados diferenciados pelos isolados Cam1 e Que2 de *Colletotrichum kahawae* em frutos verdes de Catimor 45, diferentes horas após inoculação.

Horas após inoculação	Isolados		Teste t ^a
	Cam1	Que2	
3	0	0	0,59 ^{n.s}
6	2±2	1±1	0,37 ^{n.s}
9	9±9	17±12	0,06 ^{n.s}
12	42±31	42±11	0,92 ^{n.s}
15	56±26	49±17	0,34 ^{n.s}
18	71±23	72±20	0,95 ^{n.s}
24	72±30	69±18	0,43 ^{n.s}

(x ± DP) média ± desvio padrão; ^a – Teste de t-Student; *** Significativamente diferentes (P≤0,001); ns – não significativo.

Para além da maior percentagem de conídios germinados e de apressórios formados o isolado Cam1, comparativamente ao isolado Que2, provocou lesões de maiores dimensões cujos valores foram significativamente diferentes em frutos verdes na maioria dos genótipos

testados (Quadro 12). Apenas nos genótipos 13683/25 e 13683/25 a dimensão das lesões formadas pelos dois isolados foi semelhante.

Quadro 12 - Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados em diferentes genótipos de cafeeiro 10 dias após inoculação com os isolados de Cam1 e Que2 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipo de cafeeiros	Isolados		Teste t ^a
	Cam1	Que2	
13478/2	4,82±1,35	4,36±1,41	1,72 ^{ns}
13682/8	5,10±1,09	3,69±1,17	6,51 ^{***}
13682/12	4,11±1,19	2,78±1,54	3,97 ^{***}
13682/36	4,80±1,40	3,21±1,22	5,82 ^{***}
13682/40	4,64±0,98	3,35±1,03	7,62 ^{***}
13682/42	4,97±0,95	4,29±1,34	4,22 ^{***}
13683/21	4,98±0,97	3,65±0,99	6,00 ^{***}
13683/25	4,97±1,41	5,02±1,46	0,25 ^{ns}
13683/26	4,56±0,89	2,90±1,09	9,56 ^{***}
13683/42	4,22±1,19	2,88±1,07	4,73 ^{***}
13687/17	4,33±1,25	3,07±1,16	5,71 ^{***}
13726/25	4,34±0,70	3,10±1,24	8,37 ^{***}
Catimor 45	5,19±1,19	4,38±0,99	6,17 ^{***}

(x ± DP) média ± desvio padrão; ^a – Teste de t-Student; *** Significativamente diferentes (P≤0,001); ns – não significativo.

Alguns autores ao realizarem ensaios, tanto em hipocótilos como em frutos verdes destacados, concluíram que os isolados de *C. kahawae* utilizados diferiam entre si quanto ao nível da agressividade (Várzea, 1995; Omondi *et al.*, 1997, 2000; Derso & Waller, 2003; Loureiro, 2008). Os estudos em frutos verdes destacados, confirmaram a maior agressividade do isolado Cam1 relativamente a Que2 (Várzea, 1995; Loureiro, 2008) que se traduziu em maior percentagem de conídios germinados e de apressórios formados, capacidade de causar o aparecimento mais rápido dos sintomas e de formar lesões de maior dimensão na maioria, dos genótipos de cafeeiro testados. Também em hipocótilos, o isolado Cam1 revelou maior agressividade do que Que2. Relativamente aos restantes isolados, os resultados obtidos permitiram verificar que estes poderão ser incluídos em futuras testagens, uma vez que mostraram agressividade muito alta (classe 4) na variedade Catimor 45, assim como noutros genótipos testados com excepção do isolado Ang31, que para além do controlo mostrou ser muito agressivo em apenas um genótipo (CIFC 13478/2 -Villa Sarchi) (Quadro 4). Refere-se ainda que o isolado Eti20 também apresentou elevada agressividade, particularmente no que se refere à dimensão das lesões em frutos verdes destacados e frequência de infecção (Quadro 5 e 6).

Neste trabalho também foram verificadas diferentes expressões fenotípicas, entre genótipos de cafeeiro e os isolados Que2 e Zim1 (Quadro 13) e Zim1 e Tan3 (Quadro 14). Estas expressões fenotípicas de resistência/susceptibilidade levam a supor a existência de interações, entre genótipos de cafeeiro e isolados do fungo, mas que não puderam ser quantificadas devido à insuficiência de materiais (hipocótilos) para a realização de repetições e utilização de testes estatísticos.

A partir dos resultados obtidos nas testagens dos hipocótilos (§ 3.2.1) com diferentes isolados de *C. kahawae*, foi possível obter classes de resistência (R, MR, MS e S) para os diferentes genótipos, o que leva a admitir a possível existência de raças fisiológicas.

Quadro 13 - Expressões fenotípicas entre genótipos de cafeeiro e os isolados Que2 e Zim1 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipos	Que2	Zim1
12859/3	R	R
13682/41	MR	MS
13683/17	R	MR
13683/18	R	MS
13683/25	MR	S
13687/17	MS	MR
13726/20	MS	MS
14412/6	S	S

Classes de Resistência: Susceptível (S)
 0<%HR≤25; Moderadamente Susceptível (MS)
 25<%HR≤50; Moderadamente Resistente (MR)
 50<%HR≤75; Resistente (R) %HR>75.

Quadro 14 - Expressões fenotípicas entre genótipos de cafeeiro e os isolados Zim1 e Tan3 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipos	Zim1	Tan3
13485/2	MR	MS
13682/10	S	R
13682/12	S	S
13683/35	R	R
13683/40	MS	R

Classes de Resistência: Susceptível (S)
 0<%HR≤25; Moderadamente Susceptível (MS)
 25<%HR≤50; Moderadamente Resistente (MR)
 50<%HR≤75; Resistente (R) %HR>75.

Têm sido encontradas várias interações entre genótipos de cafeeiro e isolados do fungo, contudo as interações encontradas não foram estatisticamente significativas (Omondi *et al.*, 2000).

A primeira evidência sobre a existência de raças fisiológicas em *C. kahawae*, foi referida por Rodrigues *et al.* 1992 e Várzea *et al.* 1993. Muitas são as referências sobre pequenas interações, entre genótipos de cafeeiro e isolados de *C. kahawae* (Firman & Waller, 1977; Omondi *et al.*, 2000; Masaba & van der Vossen, 1982; Várzea *et al.*, 2002a; van der Vossen, 2006). A maioria destes estudos foi realizada com genótipos de *C. arabica* e alguns deles apenas com utilização de isolados locais. Refere-se que a evidência de raças fisiológicas em *C. kahawae* foi verificada, apenas em híbridos interespecíficos tetraplóides e em híbridos complexos entre *C. arabica* e *C. canephora*.

3.2.2 - Caracterização da resistência em genótipos de cafeeiro

A caracterização da resistência, foi efectuada num conjunto de cafeeiros de entre os referidos no Quadro 2. A maioria destes cafeeiros é derivada de híbridos interespecíficos tetraplóides, apresentando resistência à ferrugem alaranjada em diferentes países cafeicultores.

Para a caracterização da resistência foi utilizado o método adoptado no CIFC “método do hipocótilo” desenvolvido por van der Vossen *et al.* (1976) e utilizada a escala de tipos de reacção descrita por van der Graaff (1981). De acordo com van der Vossen *et al.* (1976) existe uma correlação de 0,76 entre a doença no campo e o método de inoculação em hipocótilo, em condições de laboratório.

No estudo da caracterização da resistência, foram inoculados 22068 hipocótilos provenientes de descendências de 43 cafeeiros (Quadro 2). Os resultados obtidos nos diferentes ensaios encontram-se no Anexo I e II.

A partir destes resultados foi elaborado o Quadro 15, onde é referida a percentagem de hipocótilos resistentes de cada genótipo, para cada isolado. Sempre que houve disponibilidade de plântulas os mesmos genótipos, foram testados mais do que uma vez em diferentes ensaios. Os genótipos de cafeeiro foram inoculados com os seguintes isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31.

Pela análise do Quadro 15, pode verificar-se o seguinte:

- a) Todos os genótipos de cafeeiro mostraram susceptibilidade ao isolado Cam1;
- b) Das progénies provenientes da Índia (S.795 e SIn 11) inoculadas com os isolados Cam1 e Que2, apenas a progénie SIn 11 se mostrou moderadamente resistente (MR) ao isolado do Quénia;
- c) As restantes progénies da Índia (CIFC 21193, CIFC 21194, CIFC 21195, CIFC 21196 e CIFC 21197) mostraram susceptibilidade (S e/ou MS) quando inoculadas com os isolados Zim1, Tan3 e Eti10;
- d) O Híbrido de Timor HDT CIFC 832/2 apresentou resistência (89,3% de hipocótilos com resistência) ao isolado Que2. De referir que o cafeeiro HDT CIFC 832/2 é o progenitor resistente à ferrugem alaranjada da designada população Sarchimor (Villa Sarchi CIFC 971/10 x HDT CIFC 832/2);
- e) A população Sarchimor, utilizada neste ensaio, não se mostrou uniforme, podendo ser encontrados genótipos em todas as CR;
- f) Os genótipos CIFC 12859/3, CIFC 12859/5 e CIFC 13683/35 embora susceptíveis ao isolado Cam1 mostraram resistência (R) em simultâneo aos isolados Que2, Zim1 e Tan3;

- g) O genótipo Villa Sarchi CIFIC 13478/2 mostrou susceptibilidade aos isolados Cam1, Zim1 e Ang31. Este é um genótipo susceptível à ferrugem e a razão da sua utilização neste estudo foi devido ao facto de ser parental de Villa Sarchi CIFIC 971/10, um dos progenitores que deu origem à população Sarchimor.

Quadro 15 - Percentagem de Hipocótilos Resistentes (%HR) e Classes de Resistência (CR) de genótipos de cafeeiro 22 dias após inoculação com os isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipos	Cam1		Que2		Zim1		Tan3		Eti20		Eti10		Ang31	
	%HR	CR	%HR	CR	%HR	CR	%HR	CR	%HR	CR	%HR	CR	%HR	CR
832/2	8,0	S	89,3	R										
12859/3	0,0	S	97,1	R	84,3	R	95,7	R						
12859/5	0,0	S	93,7	R	89,6	R	87,5	R						
13478/2	0,0	S	*		0,0	S							0,0	S
13483/1	0,0	S	28,0	MS	14,0	S	8,0	S			8,0	S		
13483/2	*		29,6	MS										
13485/2	0,0	S	*		66,7	MR	50,0	MS			30,0	MS		
13682/6	0,0	S	35,0	MS	18,7	S	33,7	MS			17,5	S		
13682/8	0,0	S	91,0	R										
13682/9	0,0	S	*		32,7	MS	47,3	MS			29,1	MS		
13682/10	0,0	S	36,0	MS	18,0	S	78,0	R	78,0	R	48,0	MS		
13682/12	0,0	S	40,5	MS	7,0	S	11,0	S	42,0	MS				
13682/33	0,0	S	58,1	MR										
13682/36	0,0	S	72,1	MR	40,0	MS	42,0	MS			24,0	S		
13682/40	0,0	S	85,0	R										
13682/41	0,0	S	53,4	MR	42,3	MS	40,0	MS						
13682/42	1,6	S	98,4	R										
13683/17	0,0	S	85,1	R	56,3	MR	73,9	MR			16,4	S		
13683/18	0,0	S	75,7	R	44,3	MS	80,0	R						
13683/21	0,0	S	59,0	MR			71,8	MR						
13683/25	2,1	S	69,2	MR	25,0	S	21,4	S			17,9	S		
13683/26	0,0	S	84,2	R										
13683/35	0,0	S	86,8	R	79,7	R	91,2	R						
13683/40	0,0	S	13,4	S	50,0	MS	83,4	R			53,4	MR		
13683/42	7,2	S	*											
13687/17	0,0	S	26,3	MS	60,9	MR	73,2	MR			56,1	MR	98,0	R
13726/17	0,0	S	55,0	MR	45,0	MS	45,0	MS			0,0	S		
13726/20	1,1	S	49,6	MS	46,6	MS	91,5	R	86,1	R	41,1	MS	96,0	R
13726/25	2,8	S	100	R			83,4	R						
13727/18	0,0	S	38,6	MS	27,2	MS	88,6	R	52,9	MR	28,6	MS		
14412/6	0,0	S	0,0	S	0,0	S	0,0	S			0,0	S		
18863/22	0,0	S	29,0	MS	4,0	S	15,0	S	25,0	S	4,0	S		
18863/43	*		55,0	MR										
18863/61	0,0	S	83,4	R	2,0	S	0,0	S	4,3	S	0,0	S		
18863/112	*		56,5	MR										
18863/314	0,0	S	4,0	S	0,0	S	5,4	S	12,0	S	4,0	S		
S.795	0,0	S	15,5	S										
SIn11	7,4	S	60,7	MR										
21193	*		*		11,0	S	32,0	MS			40,0	MS		
21194	*		*		0,0	S								
21195	*		*		11,8	S	14,0	S			42,7	MS		
21196	*		*		0,0	S								
21197	*		*		4,0	S	7,3	S			13,6	S		

* Ensaios eliminados devido ao aumento da temperatura provocada por avaria na câmara de incubação. Classes de Resistência: Susceptível (**S**) $0 < \%HR \leq 25$; Moderadamente Susceptível (**MS**) $25 < \%HR \leq 50$; Moderadamente Resistente (**MR**) $50 < \%HR \leq 75$; Resistente (**R**) $\%HR > 75$.

Segundo van der Vossen & Walyaro (1981), em derivados de HDT no Quênia, foi caracterizado um gene no locus T de acção intermédia conferindo resistência a *C. kahawae*. Uma vez que Sarchimor também é derivado de HDT e apresenta resistência ao isolado Que2 (proveniente do Quênia) admite-se a hipótese do mesmo gene existir também nesta população.

3.2.3 - Caracterização de *dilatory resistance* a *Colletotrichum kahawae*

Dos estudos sobre *C. kahawae* realizados no CIFC, desde 1989, com a metodologia atrás descrita, têm sido seleccionados genótipos de cafeeiro com diferentes níveis de resistência a diversos isolados de *C. kahawae* (Várzea, 1995; Silva *et al.*, 2006). Alguns desses genótipos com elevados níveis de resistência, têm sido utilizados em programas de melhoramento genético, como fontes de resistência ao CBD, como acontece na Colômbia. Por outro lado, genótipos com diferentes níveis de resistência têm sido enviados para regiões africanas onde existe a doença, para ensaios de selecção e adaptação (Várzea, comunicação pessoal). No Zimbabué verifica-se que a variedade Catuai (*C. arabica*), susceptível a *C. kahawae* mostra alguma tolerância de campo ao CBD, quando comparado com outras variedades locais (Scott, comunicação pessoal). Os sintomas da doença em hipocótilos da variedade Catuai, inoculados com diferentes isolados de *C. kahawae* no CIFC apareceram mais tardiamente do que em Catimor 45, mostrando possuir *dilatory resistance* (Várzea, comunicação pessoal). Esta resistência que significa um desenvolvimento lento da doença (*slower disease development*) é idêntica à referida por Marchetti (1983) e Casela *et al.* (1993) encontrada, respectivamente em isolados de *Pyricularia oryzae* Cav. em arroz e isolados de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) em genótipos de sorgo.

Com o objectivo de se tentar caracterizar este tipo de resistência *dilatory resistance*, em genótipos previamente classificados como susceptíveis nos testes de rotina do CIFC, foi efectuado o registo, de dois em dois dias, do número de hipocótilos mortos (reacção 5) para cada genótipo inoculado em cada ensaio. A partir destes registos, elaboraram-se Quadros apresentados nos Anexos I e II com a percentagem cumulativa de hipocótilos com reacção 5 para cada genótipo de cafeeiro, relativamente a cada isolado de *C. kahawae*. Também a partir dos mesmos registos foi elaborado o Quadro 16, onde são apresentadas as diferenças entre as percentagens cumulativas de Catimor 45 (controlo susceptível) e os respectivos genótipos com reacção 5, em estudo aos 8, 10, 14 e 22 d.a.i.

Pela análise dos Quadros (Anexo I) pode verificar-se que genótipos de cafeeiros classificados como susceptíveis (Classe de resistência - S) apresentavam diferentes padrões de evolução da doença, comparativamente com Catimor 45.

Quadro 16 - Diferença entre a percentagem cumulativa de hipocótilos com reacção 5 verificada entre Catimor 45 e cada genótipo de cafeeiro aos 8, 10, 14 e 22 dias após inoculação com os isolados Cam1, Que2, Zim1, Tan3, Eti20, Eti10 e Ang31 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipo de cafeeiro	Cam1				Que2				Zim1				Tan3				Eti20				Eti10				Ang31			
	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º	8º	10º	14º	22º
832/2	-8	9	13	8	-3	27	69	81																				
12859/3	22	17	0	0	0	0	11	91	0	3	69	78	0	57	94	93												
12859/5	2	0	0	0	0	0	11	88	0	3	69	84	0	57	92	84												
13478/2	-27	-2	0	0					-28	-33	-15	0													0	-5	-45	-10
13483/1	-2	0	0	0	20	22	22	21	4	6	-1	6	6	15	-16	-4					10	55	17	8				
13483/2					-11	-17	-38	-8																				
13485/2	41	27	13	0					6	30	63	59	6	13	25	38												
13682/6	9	0	0	0	0	-1	15	29	3	11	0	11	6	19	37	22					10	74	51	17				
13682/8	14	17	6	0	0	1	14	69																				
13682/9	-2	0	0	0					6	-1	13	35	2	10	21	35					10	70	46	29				
13682/10	-2	0	0	0	32	68	28	29	6	20	7	10	4	21	48	66	5	11	32	51	10	75	71	48				
13682/12	23	32	0	0	0	0	7	34	0	2	60	1	0	53	49	8	0	100	73	42								
13682/33	12	7	0	0	0	-1	4	36																				
13682/36	13	1	0	0	0	10	4	34	6	22	59	32	4	16	19	30					10	75	64	24				
13682/40	8	0	0	0	0	1	8	62																				
13682/41	22	18	0	0	0	0	10	47	0	3	67	36	0	57	80	37												
13682/42	18	13	3	2	0	1	15	76																				
13683/17	25	20	1	1	21	23	26	48	3	11	52	49	3	37	60	67												
13683/18	10	26	7	4	0	0	11	70	0	3	66	38	0	57	90	77												
13683/21	0	0	0	0	0	-1	-3	21	2	5	69	60																
13683/25	18	31	0	0	22	18	29	63	5	18	40	20	-1	2	8	19					10	71	41	18				
13683/26	0	0	0	0	0	2	13	46																				
13683/35	22	47	4	0	0	0	11	81	0	3	69	73	0	57	91	90												
13683/40	-2	0	0	0	0	4	28	49	-1	13	33	42	6	20	41	71					7	68	65	53				
13683/42	27	27	14	7																								
13687/17	9	2	0	0	21	17	25	47	3	9	52	45	3	38	64	71					12	75	78	56	7	73	100	98
13726/17	18	10	0	0	34	52	56	48	6	20	58	37	6	23	28	33					10	60	20	0				
13726/20	11	19	6	2	11	17	29	51	1	10	54	41	0	57	92	90	1	35	44	72	21	78	85	50				
13726/25	17	3	3	3	0	2	18	62					0	0	50	80												
13727/18	53	11	0	0	34	38	42	32	6	-3	7	19	6	22	52	77	4	7	29	26	10	75	79	19				
14412/6	-2	0	0	0	-46	-28	-14	-7	-51	-70	-27	-8	-94	-77	-42	-12					-53	-25	-5	0				
18863/22	71	0	0	0	-14	-3	-30	-33	6	13	-7	-4	6	15	7	3	5	7	1	-2	10	75	19	4				
18863/43					0	-1	3	17																				
18863/61	-9	-7	0	0	0	2	1	45	0	-1	1	-2	6	-26	-32	-12	10	64	-5	0	5	-16	-21	-23				
18863/112					0	1	9	53																				
18863/314	17	0	0	0	19	4	-5	-3	6	13	-10	-8	-3	-8	-30	-7	5	1	-16	-15	10	59	10	4				
S.795	59	32	0	0	-5	-14	26	13																				
SIn 11	64	30	13	5	1	10	61	57																				
21193									0	7	53	11	11	18	-4	2					0	1	9	18				
21194									-3	-3	29	0																
21195									0	8	39	11	8	8	-2	14					0	0	18	21				
21196									-7	-7	0	0																
21197									0	8	30	4	7	3	-35	7					0	0	-13	-6				

Os valores negativos significam que a percentagem de hipocótilos com reacção 5 foi maior no genótipo de cafeeiro em estudo do que em Catimor 45 (controlo).

De referir que os cafeeiros 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 foram classificados como susceptíveis (S) (Quadro 15) quando inoculados com o isolado Cam1. Contudo, o genótipo 13683/42 (Sarchimor) mostrou desde o início do ensaio sempre menor percentagem de

hipocótilos com reacção 5 do que Catimor 45, sendo essas diferenças de 27%, 27%, 14% e 7% respectivamente aos 8, 10, 14 e 22 dias após inoculação (Quadro 16).

Por outro lado, o genótipo de cafeeiro 13478/2 (*C. arabica*, Villa Sarchi), relativamente a Catimor 45 mostrou as seguintes diferenças para os mesmos dias após a inoculação: -27%, -2%, 0% e 0% (Quadro 16). O valor negativo (-27%) significa que este genótipo apresentou uma proporção 27% superior de cafeeiros com reacção 5, em relação ao Catimor 45, sendo mais susceptível do que este.

Tal como previamente referido, as variedades indianas S.795 e Sln 11, foram classificadas como Susceptíveis (S) para o isolado Cam1, mostrando-se apenas a variedade Sln 11 Moderadamente Resistente (MR) para o isolado Que2 (Quadro 15). Aos 8 e 10 d.a.i., na interacção com o isolado Cam1, o genótipo S.795 apresentou, respectivamente menos 59% e 32% de hipocótilos com reacção 5 que Catimor 45, enquanto o cafeeiro Sln 11, para os mesmos d.a.i., apresentou menos 64% e 30% que o controlo (Quadro 16, Fig. 6).

Relativamente ao isolado Que2, o genótipo S.795 aos 10 e 14 d.a.i. apresentou respectivamente -14% e 26% de hipocótilos com reacção 5 que Catimor 45. E para os mesmos dias o genótipo Sln 11, apresentou valores, respectivamente de 10% e 61% menores que Catimor 45. De referir que aos 22 d.a.i. o genótipo Sln 11 apresentou menos 57% de hipocótilos com reacção 5, enquanto o genótipo S.795 apenas apresentou menos 13% do que o controlo (Quadro 16).

Os resultados das inoculações dos hipocótilos provenientes do cafeeiro HDT CIFC 832/2 com os isolados Cam1 e Que2 encontram-se referidos no Anexo I. Este genótipo foi considerado susceptível (S) ao isolado Cam1 e resistente (R) ao isolado Que2 (Quadro 15).

As diferenças entre as percentagens cumulativas para HDT CIFC 832/2 aos 10, 14 e 22 d.a.i. inoculado com o isolado Cam1 apresentaram, respectivamente menos 9%, 13% e 8% de hipocótilos mortos (reacção 5) que Catimor 45. O HDT 832/2 inoculado com o isolado Que2, aos mesmos d.a.i. apresentou, respectivamente menos 27%, 69% e 81% de hipocótilos com reacção 5 que Catimor 45 (Quadro 16 e Fig.7).

No Quadro 17 e Fig.5 são apresentadas as percentagens cumulativas de hipocótilos dos genótipos 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *C. kahawae*, ao longo do ensaio. A evolução da doença no genótipo 13478/2 foi mais rápida, mostrando 100% de hipocótilos com reacção 5 aos 5 d.a.i, enquanto no Catimor 45 a percentagem de hipocótilos com reacção 5 foi de 45% para os mesmos d.a.i. Para Catimor 45 a totalidade de hipocótilos com reacção 5, só se verificou para os 11 d.a.i. O genótipo 13683/42, apresentou uma evolução da doença mais lenta, principalmente a partir dos 7 d.a.i., sendo atribuída esta diferença à presença de *dilatory resistance*.

Quadro 17 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio.

Genótipos de cafeeiro	3º Dia	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13478/2	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13683/42	0	29	71	71	86	86	86	86	86	89	93
Catimor45	0	45	98	98	100	100	100	100	100	100	100

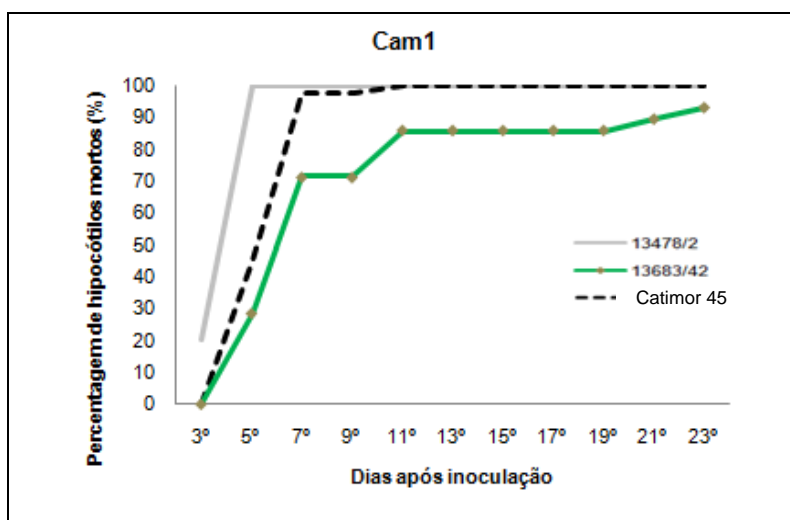


Fig. 5 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 13478/2, 13683/42 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*.

Nos Quadros 18, 19 e Fig. 6, são apresentadas as percentagens cumulativas de hipocótilos dos genótipos Sln 11, S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com os isolados Cam1 e Que2 de *C. kahawae*, ao longo do ensaio.

Foi possível observar (Quadro 18 e Fig. 6a) que a evolução da doença no genótipo Sln 11 e S.795 inoculados com o isolado Cam1, foi bastante similar até ao 10 d.a.i. De referir que para o genótipo S.795, se registou 100% de hipocótilos com reacção 5 aos 14 d.a.i., enquanto para o genótipo mais resistente (Sln 11) não se verificou a totalidade de hipocótilos com reacção 5, para todos os dias do ensaio. A evolução da doença, nos mesmos genótipos indianos não foi semelhante, apresentando diferentes níveis de *dilatory resistance* (Fig. 6a).

No final do ensaio, aos 22 d.a.i., estes dois genótipos, inoculados com o isolado Que2 (Fig. 6b) apresentaram menos hipocótilos com reacção 5, quando comparado com o isolado Cam1. Para ambos os isolados, pode referir-se que o genótipo S.795 é menos resistente que Sln 11. Esta diferença de resistência é mais notória para o Que2.

Quadro 18 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln 11 e S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio.

Genótipos de cafeeiros	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
Sln11	1	24	65	83	87	92	93	93	95
S.795	1	29	63	92	100	100	100	100	100
Catimor 45	2	88	95	100	100	100	100	100	100

Quadro 19 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln 11 e S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio.

Genótipos de cafeeiros	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
Sln11	0	0	2	19	26	31	33	36	41
S.795	0	6	26	46	64	75	81	83	85
Catimor 45	0	1	12	80	90	93	95	98	98

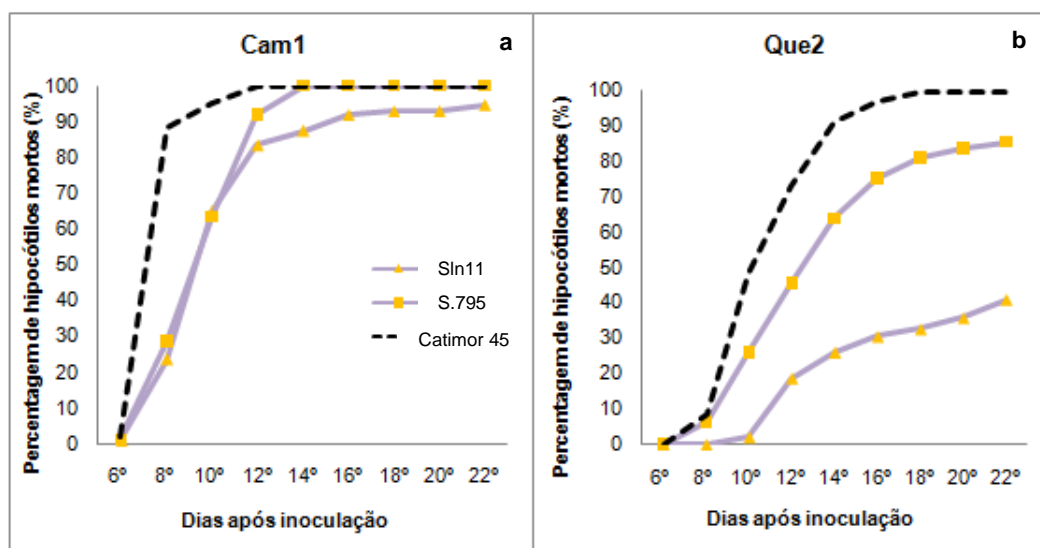


Fig. 6 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos Sln11, S.795 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 (a) e Que2 (b) de *Colletotrichum kahawae*.

As percentagens cumulativas de hipocótilos com reacção 5, no genótipo HDT CIFIC 832/2 inoculados com os isolados Cam1 e Que2, são apresentadas nos Quadros 20, 21 e Fig.7. A evolução da doença do genótipo atrás referido foi mais lenta para o isolado Que2, quando comparado com o isolado Cam1 (Fig. 7). Assim, HDT CIFIC 832/2 mostrou-se resistente quando inoculado com o isolado menos agressivo (Que2).

Quadro 20 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 832/2 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio.

Genótipos de cafeeiros	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia
832/2	0	11	37	60	83	91	92	92	92
Catimor 45	0	3	46	92	96	100	100	100	100

Quadro 21 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos 832/2 e Catimor 45 com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio.

Genótipos de cafeeiros	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia
832/2	0	0	0	1	4	4	8	11	11
Catimor 45	0	3	27	61	73	87	92	92	92

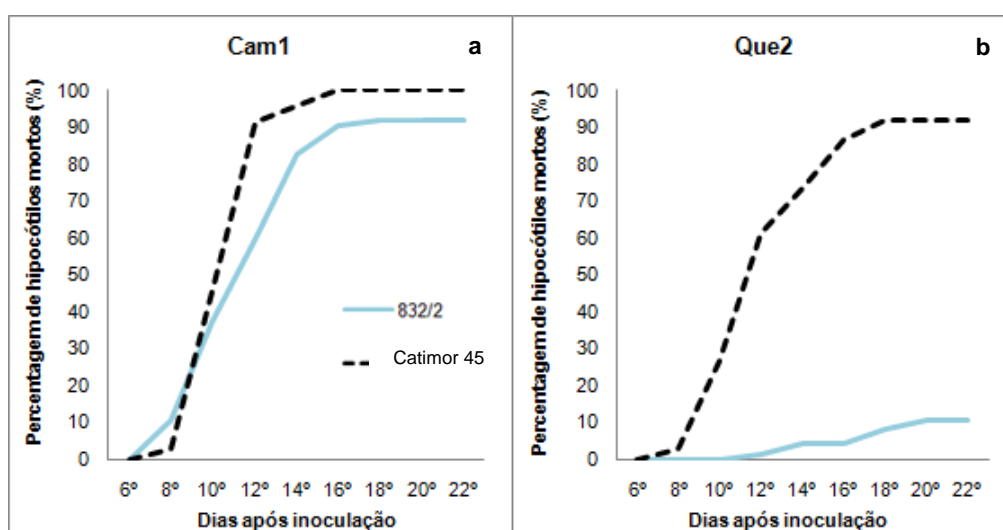


Fig. 7 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos HDT 832/2 e Catimor45 com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 (**Fig. 7a**) e Que2 (**Fig. 7b**) de *Colletotrichum kahawae*.

Os resultados apresentados no Quadro 16 e nas Figs. 5, 6 e 7 mostraram que foi possível caracterizar diferentes níveis de *dilatory resistance* em genótipos de cafeeiro classificados como susceptíveis, contrariamente ao que se verificava, quando apenas se realizava uma única leitura no final do ensaio (método de rotina utilizado no CIFC). Deste modo, uma leitura adicional 10 a 12 dias após a inoculação, poderá ser suficiente para detectar genótipos com diferentes níveis de *dilatory resistance*, dado que esta resistência retarda o

desenvolvimento da doença, tal como foi também verificado por Marchetti (1983) em arroz. Deste modo, poderá haver alguma correlação entre a tolerância encontrada no campo e este tipo de *dilatory resistance*. Casela *et al.* (1993) identificaram a existência de *dilatory resistance* em *C. graminicola* em híbridos comerciais de sorgo provenientes dos EUA e do Brasil, em testes realizados no campo.

Como se pode observar no Quadro 16, para caracterizar *dilatory resistance* com o isolado Cam1, poderia ser suficiente uma leitura inicial ao fim de 8 dias após a inoculação. Contudo para o isolado Zim1, uma única leitura poderia ser efectuada aos 14 dias após a inoculação. Nos outros isolados, não é evidente qual a melhor data para a realização de uma única leitura. De qualquer modo, pensa-se que para a escolha de uma data para a realização de mais uma leitura adicional, deveriam ser realizados mais ensaios idênticos, para uma melhor caracterização do padrão de resistência dos diferentes materiais.

Foram caracterizados diferentes níveis de *dilatory resistance* em genótipos de cafeeiro susceptíveis, nomeadamente quando inoculados com isolados de muito alta agressividade (CA=4) como o isolado Cam1. Refere-se que Marchetti (1983) também verificou a existência de *dilatory resistance* que poderia ser específico para certos isolados de *P. oryzae*.

3.2.4 - Processo de infecção do fungo

As variedades indianas Sln 11 e S.795, tal como já foi referido, apresentam em condições de campo níveis elevados de resistência à ferrugem alaranjada (Prakash, comunicação pessoal) e por essa razão, no presente trabalho foi testada a resistência destas variedades a *C. kahawae*. Para além das testagens relativas à caracterização da resistência (§ 3.2.2 e 3.2.3) foram efectuados estudos histológicos em Sln 11 e S.795 para melhor caracterizar a sua resistência a *C. kahawae*. Estes estudos incidiram nas fases de pré e pós penetração dos isolados Cam1 e Que2 e nas respostas induzidas nas plantas. Como controlo susceptível foi utilizada a variedade Catimor 45.

O processo de infecção de *C. kahawae*, à semelhança de outras espécies de *Colletotrichum* inicia-se com a germinação de conídios e a diferenciação de apressórios melanizados que penetram directamente a cutícula (Perfect *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2008; Horbach *et al.*, 2010). A maior parte dos conídios de *Colletotrichum* spp. pode formar apressórios e iniciar o processo de infecção, num período de 9 a 72 horas após inoculação (Ogle *et al.*, 1990; Mould *et al.*, 1991). No presente trabalho, foi feita a avaliação da germinação de conídios e a formação de apressórios melanizados, 15 h.a.i. (Quadros 22 e 23, Fig. 8).

Quadro 22 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelo isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae* em hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, 15 horas após inoculação.

Genótipos de cafeeiros	Estruturas do fungo		
	% Conídios germinados (x ± DP)	% Apressórios * (x ± DP)	% Apressórios melanizados (x ± DP)
SIn 11	40±12 a	60±27 a	42±23 a
S. 795	52±16 a	82±12 b	68±14 b
Catimor 45	52±19 a	83±9 b	69±16 b

* Considerou-se o total de apressórios, isto é, melanizados e não melanizados. (x ± DP) média ± desvio padrão. Em cada coluna, os valores médios seguidos pela mesma letra não se diferenciam significativamente, de acordo com o teste de MDS de Fisher ($P \leq 0,05$).

Quadro 23 - Percentagem de conídios germinados e de apressórios diferenciados (melanizados e não melanizados) pelo isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae* em hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, 15 horas após inoculação.

Genótipos de cafeeiros	Estruturas do fungo		
	% Conídios germinados x ± DP	% Apressórios * x ± DP	% Apressórios melanizados x ± DP
SIn 11	58±21 a	69±23 a	57±20 a
S. 795	47±20 a	80±17 a	62±24 a
Catimor 45	60±23 a	75±18 a	51±32 a

* Considerou-se o total de apressórios, isto é, melanizados e não melanizados. (x ± DP) média ± desvio padrão. Em cada coluna, os valores médios seguidos pela mesma letra não se diferenciam significativamente, de acordo com o teste de MDS de Fisher ($P \leq 0,05$).

O isolado Que2 apresentou uma percentagem de conídios germinados que variou entre os 40% e os 52% e que não se diferenciou significativamente nos três genótipos em estudo. As percentagens de apressórios (melanizados e não melanizados) e de apressórios melanizados foi significativamente inferior em SIn11 comparativamente a S.795 e Catimor 45, onde esses valores não se diferenciaram entre si.

Relativamente ao isolado Cam1, as percentagens de conídios germinados, total de apressórios formados e de apressórios melanizados foram semelhantes nos três genótipos. A menor capacidade do isolado Que2 para diferenciar apressórios em SIn 11 do que nos restantes genótipos parece sugerir a possibilidade de existir em SIn 11 algum mecanismo de defesa constitutivo, à semelhança do que é referido por Gichuru (1997) em genótipos de *C. arabica*. No entanto, essas defesas a existirem em SIn 11 aparentemente são “ultrapassadas” pelo isolado Cam1, que é mais agressivo do que Que2.

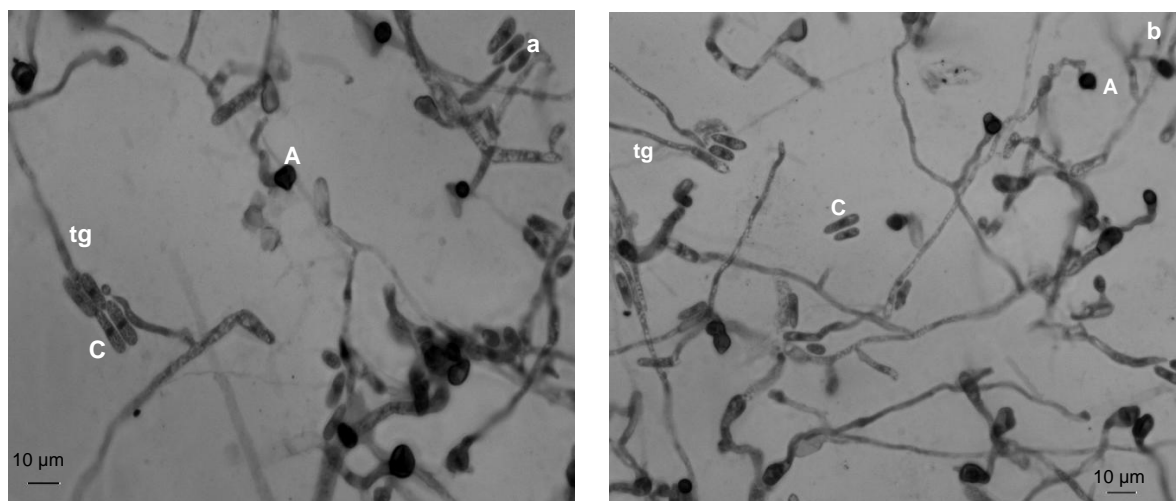


Fig. 8 - Germinação de conídios e formação de apressórios dos isolados Cam1 (a) e Que2 (b) de *Colletotrichum kahawae* na superfície de hipocótilos de Catimor 45, 15 horas após inoculação. Observações ao microscópio óptico de campo claro, coloração com azul de algodão em lactofenol. Conídio (C); tubo germinativo (tg); apressório (A).

A melanização do apressório é essencial para que ocorra a penetração da cutícula e epiderme da planta (Perfect *et al.*, 1999; Deising *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2008). Para ambos os isolados em estudo, os apressórios melanizados iniciaram a penetração nos hipocótilos dos diferentes genótipos a partir das 15 h.a.i.

A hifa de penetração formada a partir dos apressórios melanizados, sofreu um adelgaçamento ao atravessar a parede das células da epiderme, intumescendo e formando uma vesícula de infecção (Fig. 9a), a partir da qual se formaram hifas que cresceram intra- e intercelularmente (Fig. 9b,c).

Em Catimor 45 (genótipo susceptível) e tal com previamente descrito por Garcia (1999), Silva *et al.* (2006) e Loureiro *et al.* (2008), os dois isolados de *C. kahawae* apresentaram crescimento hemibiotrófico.

De acordo com Perfect *et al.* (1999), Latunde-Dada (2001) e Munch *et al.* (2008) este tipo de colonização hemibiotrófica é a mais frequente nas espécies de *Colletotrichum*.

No genótipo susceptível, a fase de biotrofia durou 48 e 72 h.a.i., respectivamente nos isolados Cam1 e Que2. À medida que o fungo avançou na colonização do tecido hospedeiro, a fase biotrófica repetiu-se observando-se, simultaneamente, o desenvolvimento do fungo em células vivas e em células mortas do hospedeiro (Fig. 9d).

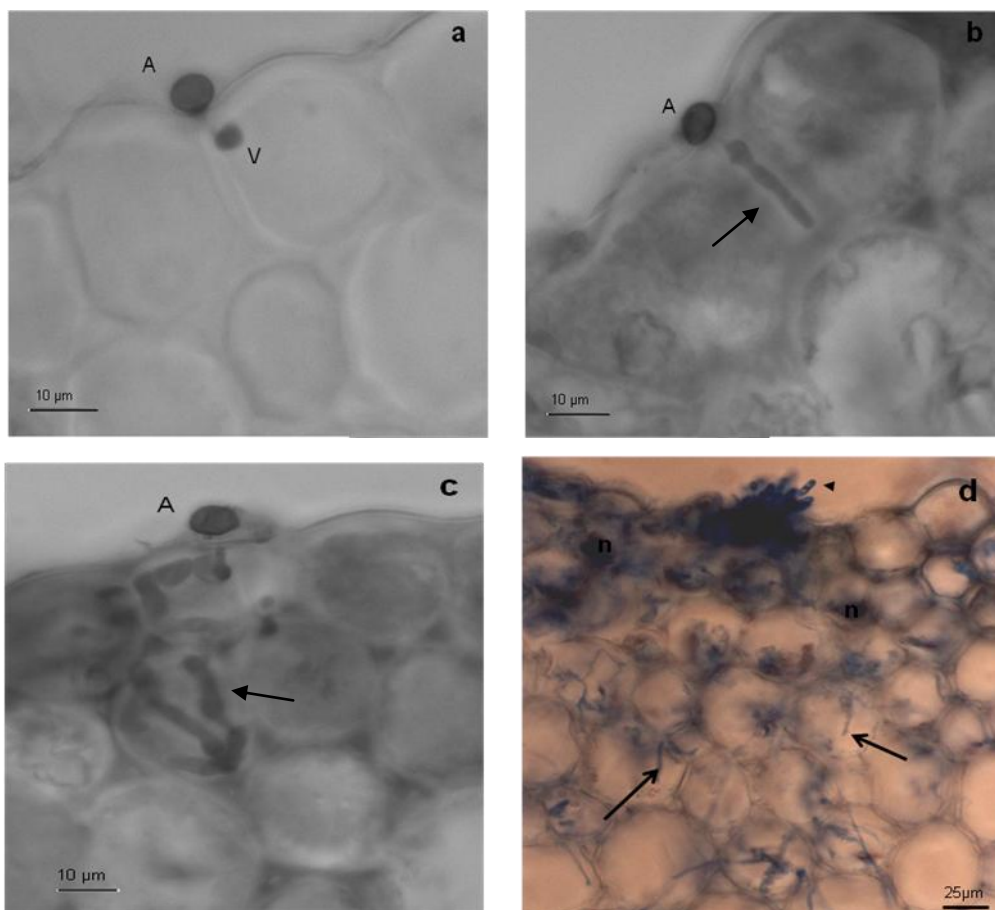


Fig. 9 - Processo de infecção do isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae* em hipocótilos dos genótipos Sln 11 (Figs. 9 a,b,c) e Catimor 45 (Fig. 9d). Observações ao microscópio óptico, coloração com azul de algodão em lactofenol. **Fig. 9a.** Zona de infecção com apressório (A) melanizado e vesícula de infecção (v), 48 h.a.i. **Fig. 9b.** Zona de infecção mostrando apressório (A) melanizado e hifa intracelular (seta), 72 h.a.i. **Fig. 9c.** Zona de infecção mostrando apressório (A) melanizado e hifas intra- e intercelulares (seta), 72 h.a.i. **Fig. 9d.** Hifas inter e intracelulares (setas) em células vivas e em células necrosadas (n) e começo da esporulação (ponta da seta), 7 dias após a inoculação.

Em Sln 11 e S.795, a partir das 72 h.a.i., também se observou o crescimento hemibiotrófico dos isolados Que2 e Cam1, mas numa percentagem reduzida de zonas de infecção.

A colonização intensa do fungo em células mortas de hipocótilos, do genótipo susceptível dificultou a visualização das hifas, por essa razão a quantificação do crescimento dos dois isolados nos diferentes genótipos só foi efectuada entre as 15 h.a.i. e as 72 h.a.i. (Quadros 24 e 25).

O isolado Que2 apresentou um crescimento significativamente mais reduzido em Sln 11 do que em Catimor 45, a partir das 24 h.a.i., o mesmo se tendo verificado com o isolado Cam1, a partir das 48 h.a.i. Relativamente a S.795, o isolado Que2 apresentou um comprimento de hifas que se situou entre os valores observados em Sln11 e Catimor 45, mas que só foi

significativamente inferior ao registado no genótipo susceptível às 72 h.a.i., não se diferenciando contudo de SIn 11.

Quadro 24 - Valores médios do comprimento das hifas do isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae* no interior dos hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, em diferentes tempos após a inoculação.

Horas após inoculação	Genótipos de cafeeiro		
	SIn 11	S.795	Catimor 45
15	9,51±3,12	12,99±9,17	14*
24	14,76±2,84 a	17,85±4,02 ab	21,39±2,84 b
48	19,95±2,80 a	29,4±4,72 b	24,69±1,08 b
72	36,99±4,01 a	44,94±5,13 a	57,00±2,60 b

* Apenas foi encontrada uma infecção com 14 µm, não sendo possível o tratamento estatístico. Em cada linha, os valores médios seguidos pela mesma letra não se diferenciam significativamente, de acordo com o teste de Fisher ($P \leq 0,05$). ($\bar{x} \pm DP$) média \pm desvio padrão.

Ainda em S.795, o isolado Cam1 apresentou nos diferentes tempos após a inoculação um crescimento mais próximo dos valores registados no genótipo susceptível. Porém, às 72 h.a.i., o comprimento das hifas não se diferenciou significativamente dos valores do genótipo susceptível nem de SIn 11.

Quadro 25 - Valores médios do comprimento das hifas do isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae* no interior dos hipocótilos de diferentes genótipos de cafeeiro, em diferentes tempos após a inoculação.

Horas após inoculação	Genótipos de cafeeiro		
	SIn 11	S.795	Catimor 45
15	13,89±4,18 a	11,01±1,76 a	16,98±0,97 a
24	15,51±2,29 ab	13,50±7,55 a	18,24±1,23 a
48	16,50±2,59 a	29,94±5,69 b	31,11±5,65 b
72	46,41±9,56 a	59,19±10,49 ab	64,11±3,77 b

Em cada linha, os valores médios seguidos pela mesma letra não se diferenciam significativamente, de acordo com o teste de Fisher ($P \leq 0,05$). ($\bar{x} \pm DP$) média \pm desvio padrão.

No genótipo susceptível Catimor 45, os isolados Que2 e Cam1 originaram o aparecimento dos sintomas (lesões necróticas em depressão com esporulação), aos 6 dias após a inoculação. No genótipo S.795, os dois isolados acabaram por originar sintomas de susceptibilidade, também a partir dos 6 dias após a inoculação.

Neste genótipo de cafeeiro, a quase totalidade dos hipocótilos apresentaram reacção de susceptibilidade quando inoculados com o isolado Cam1, mas no caso do isolado Que2 cerca de 10-20% de hipocótilos apresentaram lesão de resistência do tipo *scab*. Em Sln 11 o isolado Cam1 originou sintomas de susceptibilidade em cerca de 80% dos hipocótilos, tendo-se observado a lesão de resistência tipo *scab* nos restantes 20%, a situação inversa foi verificada na inoculação com o isolado Que2. Estes sintomas começaram a observar-se aos 6 dias nos hipocótilos de Sln 11 inoculados com Cam1 e aos 9 dias em Que2.

A lesão tipo *scab* verificada nos hipocótilos de Sln 11 e de S.795 correspondeu a um crescimento do fungo limitado às primeiras camadas de células do córtex associado a alterações na parede das células do hospedeiro (autofluorescência, indicadora da acumulação de compostos fenólicos) e à rápida deposição de calose em redor de algumas hifas intracelulares (Figs. 10a e 10b).

As modificações estruturais ao nível da parede celular, envolvendo a deposição de fenóis e mais tarde a formação de lenhina (resultante da polimerização dos fenóis), assim como a incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e de polissacáridos, parecem desempenhar um papel importante como barreira à penetração do agente patogénico, sendo muitas vezes associadas à resistência das plantas aos agentes patogénicos (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Heath 1997; Shimada *et al.*, 2006). Em genótipos de cafeeiro, em particular em certos derivados de Híbrido de Timor, Silva *et al.* (2006), Loureiro (2008) e Loureiro *et al.* (2008) referem igualmente a acumulação de fenóis nas paredes celulares como uma das respostas de resistência a *C. kahawae*, à semelhança do que é referido noutras interações hospedeiro-*Colletotrichum* sp. incompatíveis (Esquerré-Tugayé *et al.* 1992; Barreto *et al.*, 2007).

A deposição de calose entre o plasmalema e a parede celular, pode ocorrer em resposta a *stresses*, ferimentos e à invasão por um agente patogénico (Skalamera & Heath, 1995). Estes depósitos de calose podem bloquear a transferência de nutrientes do hospedeiro para o agente patogénico ou atrasar o seu crescimento para que outras respostas do hospedeiro se tornem activas (Allen & Friend, 1993; Donofrio & Delaney, 2001). Além disso, a calose poderá servir como meio de deposição para compostos tóxicos ou toxinas (Aist, 1976; Allen & Friend, 1993; Donofrio & Delaney, 2001; Mims & Vaillancourt, 2002).

Em muitas interações planta-*Colletotrichum* sp., como por exemplo em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e espécies de *Colletotrichum* (Shimada *et al.*, 2006) e em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e *C. gloeosporioides* (Barreto *et al.*, 2007), a resistência está associada à rápida deposição de calose, em *papillas*, imediatamente abaixo do local da infecção.

Apesar da deposição da calose, no caso de Sln 11 e S.795, tal como foi referido por Silva *et al.* (2006) e Loureiro (2008) em alguns genótipos de cafeeiro resistentes a *C. kahawae*, se

verificar em torno das hifas intracelulares e não em *papillas*, esta parece ser uma rápida resposta de defesa do hospedeiro. Ainda em Catimor 45 (genótipo susceptível), verificou-se também a deposição de calose em redor de algumas hifas (Fig. 10c), em fases mais avançadas do processo de infecção (cerca de 4 dias após a inoculação). Esta resposta tardia da planta, também referida por Garcia (1999), Silva *et al.* (2006), Loureiro (2008) e por Loureiro *et al.* (2008), não foi suficiente para impedir o desenvolvimento do fungo e dos sintomas da doença.

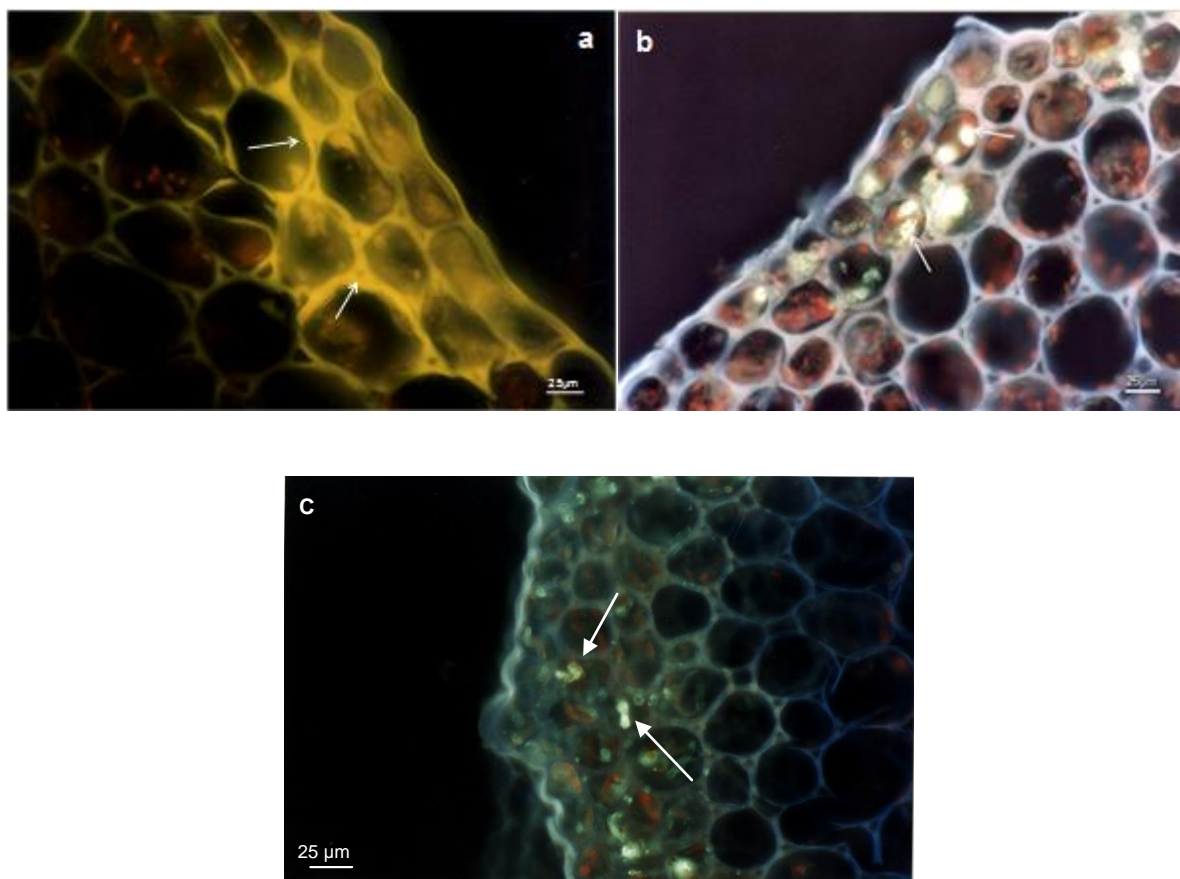


Fig. 10 - Respostas celulares induzidas pelo isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae* em hipocótilos dos genótipos Sln 11 e Catimor 45, 10 dias após inoculação. Observações ao microscópio óptico. **Fig. 10a.** Teste de epifluorescência com luz azul. Zona de infecção onde se observa autofluorescência das paredes das células do hospedeiro (setas), indicador da acumulação de compostos fenólicos. **Fig. 10b** e **Fig. 10c.** Teste de azul de anilina, luz uv. Zonas de infecção mostrando acumulação de calose em torno das hifas intracelulares (setas) em Sln11 (Fig. 10b) e Catimor 45 (Fig. 10c).

As testagens referentes à caracterização da resistência (§ 3.2.2 e 3.2.3) e os estudos histológicos efectuados, mostraram que as variedades indianas Sln 11 e S.795 apresentaram um nível moderado de resistência a isolados menos agressivos de *C. kahawae*, como é o caso de Que2. Esse nível de resistência mostrou-se contudo maior em Sln 11 o que parece indicar que esta variedade poderá ter tolerância à doença em condições de campo.

4 - Conclusões e perspectivas

No presente estudo, foi caracterizada a agressividade de isolados de *C. kahawae* provenientes do Quênia (Que2), Camarões (Cam1), Zimbabué (Zim1), Tanzânia (Tan3), Etiópia (Eti20 e Eti10) e Angola (Ang31) em frutos verdes destacados e em hipocótilos de cafeeiro.

Foram estabelecidas quatro classes de agressividade para classificar os isolados de acordo com as reacções apresentadas, ao fim de 22 dias após inoculação em hipocótilos.

O isolado Cam1 mostrou maior agressividade, tanto em frutos verdes destacados como em hipocótilos (CA=4) comparativamente com todos os outros isolados.

Em frutos verdes destacados, o isolado Eti20 foi o que apresentou maior agressividade (próxima de Cam1) comportando-se o isolado de Angola (Ang31) como o menos agressivo. Os restantes isolados apresentaram níveis intermédios de agressividade.

Todos os isolados, mostraram elevada agressividade (CA=4) quando inoculados em hipocótilos de Catimor 45. Por outro lado, têm sido caracterizados vários genótipos de cafeeiro, no CIFC, com níveis de susceptibilidade mais elevados que Catimor 45, a diferentes isolados de *C. kahawae*. Neste trabalho o genótipo, CIFC 13478/2 Villa Sarchi mostrou ser o mais susceptível, e no futuro poderá vir a ser usado como controlo susceptível, em substituição do Catimor 45.

Os resultados das testagens realizadas com estes isolados, em hipocótilos de diferentes genótipos, permitiram verificar a existência de variabilidade relativamente à virulência. Esta variabilidade evidência a existência de possíveis raças fisiológicas, neste agente patogénico. Contudo, as interacções não puderam ser quantificadas, devido à insuficiência de materiais (hipocótilos) para realização de repetições e aplicação de testes estatísticos.

Foram constituídas quatro classes de resistência (S, MS, MR, R) para classificar os 43 genótipos de cafeeiro estudados.

Todos os genótipos de cafeeiro, inoculados com o isolado Cam1, mostraram-se susceptíveis.

Foi encontrada variabilidade para a resistência na população Sarchimor. Nesta população destacaram-se os genótipos 12859/3, 12859/5 e 13683/35 por mostrarem maior nível de resistência.

Nos genótipos provenientes da Índia, destaca-se SIn 11 que se mostrou moderadamente resistente (MR) quando inoculado com o isolado Que2.

Os genótipos de cafeeiro, referidos atrás mostram potencial para serem incorporados em programas de melhoramento genético, mas a sua resistência deverá ser melhor caracterizada, relativamente a outros isolados da colecção do CIFC.

Foram caracterizados diferentes níveis de *dilatory resistance* em genótipos de cafeeiros susceptíveis, nomeadamente quando inoculados com isolados de muito alta agressividade (CA=4) como o isolado Cam1.

Trabalhos anteriores realizados no CIFC, têm mostrado que para diferentes genótipos de cafeeiro, um mesmo tipo de reacção de resistência a um determinado isolado de *C. kahawae*, pode corresponder a diferentes padrões de crescimento do fungo e respostas celulares da planta.

Em relação aos estudos histológicos, a susceptibilidade foi verificada na totalidade dos hipocótilos de Catimor 45 e em baixa percentagem em hipocótilos de SIn 11 e S.795. Os sintomas de resistência (lesão tipo *scab*) também foram observados em hipocótilos de SIn 11 e S.795, correspondendo a uma intensa colonização do fungo, associada à deposição de calose em torno de algumas hifas intracelulares e modificações nas paredes celulares do hospedeiro, devido à acumulação de compostos fenólicos.

Em trabalhos futuros relacionados com o capítulo da patogenicidade, sugere-se a continuação dos estudos de virulência destes isolados, com os mesmos e com outros genótipos de cafeeiro, não só para caracterizar possíveis raças fisiológicas, como também para caracterizar a sua variabilidade a nível molecular.

Estudos de selecção e adaptação no campo, onde existe a doença, poderão dar mais informação sobre o modo como a *dilatory resistance*, encontrada em laboratório, se poderá expressar em possível tolerância de campo.

Sugere-se a realização de análises genéticas da resistência, com diferentes isolados de *C. kahawae* com o objectivo de tentar descobrir novos genes de resistência em diferentes genótipos de cafeeiro, tal como em derivados de HDT.

A caracterização macroscópica da resistência deverá ser assim, complementada com estudos histológicos e se possível também ao nível molecular. Contribuindo assim, para uma mais adequada selecção de fontes de resistência a serem utilizadas, em futuros programas de melhoramento genético, visando a resistência a esta doença.

Referências Bibliográficas

- Aga, E., Bryngelsson, T., Bekele, E. & Salomon, B. (2003). Genetic diversity of forest arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Hereditas* **138**: 36-46.
- Agnihotrudu, V., Edward, J.C., Tripathi, S.C. & Sharma, N.N. (1986). *Pseudomonas syringae* Van Hall and *Meloidogyne javanica* (treub) Chitwood in coffee die back complex. *Journal of Coffee Research* **16**: 23-27.
- Aist, J.R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annual Review of Phytopathology* **14**: 145-163.
- Allen, F. & Friend, J. (1993). Resistance of potato tubers to infection by *Phytophthora infestans*: a structural study of haustorial development. *Physiological Plant Pathology* **22**: 285-292.
- Andreasen, K., Bermer, B. (2000). Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany* **87**: 1731-1748.
- Barreto, A.L.H., Vasconcelos, I.M., Grangeiro, T.B., Melo, V.M.M., Matos, T.E., Eloy, R.G., Fernandes, C.F., Torres, D.C., Freire-Filho, F.C.O. & Oliveira, J.T.A. (2007). Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. *International Journal of Plant Science* **168**: 193-203.
- Bedimo, J.A.M., Bieysse, D., Nyassé, S., Nottéghem, J.L. & Cilas, C. (2010). Role of rainfall in the development of coffee berry disease in *Coffea arabica* caused by *Colletotrichum kahawae*, in Cameroon. *Plant Pathology* **59**: 324-329.
- Bedimo, J.A.M., Njiayoum, I., Bieysse, D., Ndoumbè Nkeng, M., Cilas, C., Nottéghem, J.L. (2008). Effect of shade on Arabica Coffee Berry Disease Development: Toward an Agroforestry System to Reduce Disease Impact. *Phytopathology* **98**: 1320-1325.

- Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M. & Mansfield, J. (1996). The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. *Plant Journal* **9**: 851-865.
- Bettencourt, A.J. & Rodrigues Jr., C.J. (1988). Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke, R.J. & Macrae, R. (Eds.). *Coffee Agronomy Vol. 4*. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London and New York, pp 199-234.
- Beynon, S.M., Coddington, A., Lewis, B.G. & Várzea, V.M.P. (1995). Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**: 457-470.
- Biratu, T. (1995). *Studies on Colletotrichum population of Coffea arabica L. in Ethiopia and evaluation of the reactions of coffee germplasms*. Doctoral thesis. Bonn, Ethiopien, 231pp.
- Birikunzira, J.B. (1982). Country Report: Uganda Coffee Berry Disease. *First Regional Workshop on Coffee berry disease*. Addis Abeba, Etiópia, 19-23 Jul., 1982. pp 97 - 101.
- Bridge, P.D., Waller, J.M., Davies, D. & Buddie, A.G. (2008). Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. *Journal of Phytopathology* **156**: 274-280.
- Bridson, D.M. & Verdcourt, B. (1988). Rubiaceae (Part 2). In: Polhill, R.M. (Ed.). *Flora of Tropical East Africa*. Bookfield Balkema, Rotterdam. pp 703-723.
- Cardoso, A.P.S. (1994). *Café, cultura e tecnologia primária*. Ministério do Planeamento e Administração do Território. Secretaria do Estado da Ciência e Tecnologia. Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisboa, 169 pp.
- Carvalho, A.C., Ferwerda, A.F.P., Frahm-Leliveld, J.A., Medina, D.M. & Mendes A.J.T., Monaco L.C. (1969). *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre ex Froehner In: Ferwerda F.P. & Wageningen F. W. (Eds.). *Outlines of perennial crops breeding in the tropics*. pp 189-241.

- Carvalho, A. & Mónaco, L.C. (1976). Café Icatú como fonte de resistência a *Colletotrichum coffeanum*. *Bragantia* **35**: 343-347.
- Carvalho, C.H.S. (2008). Cultivares de café. Origem, características e recomendações. Embrapa Café, Brasília, DF. 334pp.
- Caselas, C.R., Frederiksen, R.A. & Ferreira, A.S. (1993). Evidence for dilatory resistance to anthracnose in sorghum. *Plant Disease* **77**: 908-911.
- Charrier, A. & Berthaud, J. (1985). Botanical classification of coffee. *In*: Clifford, M.N. & Wilson, K.C. (Eds.). *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Croom Helm, London and Sydney, pp 13-47.
- Chen, Z.J. (2002). *Morphocultural and pathogenic comparisons between Colletotrichum kahawae and Colletotrichum gloeosporioides isolated from coffee berries*. Tese de Doutorado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, 163 pp.
- Chen, Z., Liang, J., Zhang, C. & Rodrigues Jr., C.J. (2006). Epicatechin and catechin may prevent coffee berry disease by inhibition of appressorial melanization of *Colletotrichum kahawae*. *Biotechnology Letters* **28**: 1637-1640.
- Chen, Z., Nunes, M.A., Silva, M.C. & Rodrigues Jr., C.J. (2004). Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* may have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia* **96**: 1199-1208.
- Correia, A.M.N.G. (1995). *Manual da Tecnologia do Café*. CULTIVAR – Associação de Técnicos das Culturas Tropicais. 117 pp.
- Cronquist, A. (1988) *The evolution and classification of flowering plants*. New York Botanical Garden Press.
- Cros, J., Combes, M.C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., Charrier, A. & Lashermes, P. (1998). Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**: 109-117.

- da Ponte, A.M. (1965). Ainda sobre a pulverização do cafeeiro Arabica com superfosfato de cálcio contra a antracnose ou queda dos frutos, normalmente atribuída ao *Colletotrichum coffeanum* Noack. *Instituto de Investigação Agronômico de Angola*. 6 pp.
- Davis, A.P. (2003). A new combination in *Psilanthus* (Rubiaceae) for Australia, and nomenclatural notes on *Paracoffea*. *Novon* **13**: 182-184. (In: Davis et al., 2006).
- Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M. & Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 465-512.
- Deising, H.B, Werner, S. & Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**: 1631-1641.
- Derso, E. & Waller, J.M. (2003). Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. *Crop Protection* **22**: 561-565.
- Donofrio, N.M. & Delaney, T.P. (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defence-compromised *Arabidopsis nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 439-450.
- Eschrich, W. & Currier, H.B. (1964). Identification of callose by its diachrome and fluochrome reactions. *Stain Technology* **39**: 303-304.
- Esele, J.P., Frederiksen, R.A. & Miller, F.R. (1993). The association of genes controlling caryopsis traits with grain mold resistance in sorghum. *Phytopathology* **83**: 490-495.
- Esquerré-Tugayé, M-T., Mazau, D., Barthe, J-P., Lafitte & Touzé, A. (1992). Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK. pp 121-133.
- Ferrão, J.E.M. (2009). *O café: A bebida negra dos sonhos claros*. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa, Portugal. 223 pp.
- Firman, I.D. (1964). Screening of coffee for the resistance to coffee berry disease. *East African Agricultural Journal* **29**: 192-194.

- Firman, I.D. & Waller, J.M. (1977). Coffee berry disease and other *Colletotrichum* disease of coffee. *Phytopathological Papers*, nº 20. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 53 pp.
- Garcia, I.V.A.N. (1999). *Histologia e ultra-estrutura do processo de infecção de Colletotrichum kahawae e Colletotrichum gloesporioides em Coffea arabica*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 96 pp.
- Gibbs, J.N. (1969). Inoculum sources for coffee berry disease. *Annals of Applied Biology* **64**: 515-522.
- Gichuru, E.K. (1997). Resistance mechanisms in Arabica coffee to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae* Sp. Nov.) – A Review. *Kenya Coffee* **727**: 2441-2444.
- Gichuru, E.K., Agwanda, C.O., Combes, M-C., Mutitu, E.W., Ngugi, E.C.K., Bertrand, B. & Lashermes, P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea Arabica*. *Plant Pathology* **57**: 1117-1124.
- Gichuru, E.K., Várzea, V.M.P., Rodrigues Jr., C.J. & Masaba, D.M. (2000). Vegetative compatibility grouping of *Colletotrichum kahawae* in Kenya. *Journal of Phytopathology* **148**: 233-237.
- Griffiths, E. (1968). *Plant pathology*. Annual Report of the Coffee Research Foundation 1967/68, Kenya, pp 43-48.
- Griffiths, E., Gibbs, J.N. & Waller, J.M. (1971). Control of Coffee Berry Disease. *Kenya Coffee* **36**: 307-328.
- Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H.G., Martins, A.C., Silva, M.C., Gichuru, E.K., Várzea, V. & Bertrand, B. (2006). Antagonistic interaction between *Epicoccum nigrum* and *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of coffee berry disease. *Proceedings of the 21th International Conference on Coffee Science (ASIC), Montpellier, France, 11-15 September 2006*: 1284-1290 pp.

- Heath, M.C. (1997). Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Annals of Botany* **80**: 713-720.
- Hindorf, H. (1970). *Colletotrichum* spp. isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **77**: 328-331.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R, Knogge, W. & Deising, H.B. (2010). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **168**: 51-62.
- International Coffee Organization www.ico.org (2010) acesso em Dezembro de 2010.
- Jeffries, P. & Koomen, I. (1992). Strategies and prospects for biological control of diseases caused by *Colletotrichum*. In: Jeger, M.J. & Bailey, J.A., (Eds.). *Colletotrichum*, CAB International, Wallingford, UK, pp 337-357.
- Kim, K.H., Yoon, J.B., Park, H.G., Park, E.W. & Kim, Y.H. (2004). Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathology* **94**: 1295-1304.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F. & Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. 10th Edition, CABI, Wallingford, UK, 784pp.
- Kumar, A.C. (1988). Nematode problem of coffee and its management. *Indian Coffee* **52**: 12-19.
- Lampard, J.F. & Carter, G.A. (1973). Chemical investigations on resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica*. An antifungal compound in coffee cuticular wax. *Annals of Applied Biology* **73**: 31-37.
- Latunde-Dada, A.O. (2001). *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* **2**: 187-198.
- Loureiro, A.S.B.C. (2008). *Caracterização da resistência à antracnose dos frutos verdes do cafeeiro*. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 230pp.

- Loureiro, A., Silva, M.C., Várzea, V., Moncada, P., Bertrand, B. & Nicole, MR. (2008). Histological and ultrastructural characterization of coffee resistance to *Colletotrichum kahawae*. Proceedings of the 22nd International Conference on Coffee Science (ASIC). Campinas, São-Paulo, Brazil, 14-19 September 2008: 1040-1044.
- Macedo, F.W.V.P. (1994). *A antracnose dos frutos do cafeeiro induzida pelo fungo Colletotrichum coffeanum Noack*. Relatório Final de Estágio. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 41 pp.
- Manga, M.B. (1999). *Étude de la diversité de Colletotrichum kahawae responsable de l'antracnose des baies et caractérisation de la résistance du caféier arabica à cet agent pathogène*. Thèse Doctorat. Université Montpellier, Montpellier, France.
- Manga, M.B., Bieysse, D., Mouen, Bedimo, J.A., Akalay, I., Bompard, E. & Berry, D. (1997). Observation sur la diversité de la population de *Colletotrichum kahawae* agent de l'antracnose des baies du caféier Arabica. Implications pour l'amélioration génétique. *Proceedings of the 17th International Colloquium on Coffee (ASIC)*. Nairobi, Kenya, 20-25 July 1997: 604-612.
- Manuel, L., Talhinhos P., Várzea, V. & Neves-Martins, N. (2010). Characterization of *Colletotrichum kahawae* Isolates Causing Coffee Berry Disease in Angola. *Journal of Phytopathology* **158**: 310-313.
- Marchetti, M.A. (1983). Dilatory resistance to rice blast in USA rice. *Phytopathology* **73**: 645–649.
- Masaba, D.M. (1982). *Mechanisms of resistance*. Annual Report of the Coffee Research Foundation 1977/78 Kenya, pp 43-48.
- Masaba, D.M. (1991). *The role of saprophytic microflora in the development of coffee berry disease (Colletotrichum coffeanum) in Kenya*. PhD. Thesis, University of Reading, 241pp.
- Masaba, D.M. & Helderman, K. (1985). *Mechanisms of resistance to CBD*. Annual Report of the Coffee Research Foundation 1984/85, Kenya, 101 pp.

- Masaba, D.M. & van der Vossen, H.A.M. (1982). Evidence of cork barrier formation as a resistance mechanism to berry disease (*Colletotrichum coffeanum*) in arabica coffee. *The Netherlands Journal of Plant Pathology* **88**: 19-32.
- Masaba, D.M. & Waller, J.M. (1992). Coffee berry disease: the current status. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB international, Wallingford, UK, pp 237-249.
- McDonald, J. (1926). A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya. *Transactions of the British Mycological Society* **11**: 145-154.
- Meeley, R.B., Johal, G.S., Briggs, S.P. & Walton, J.D. (1992). A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *The Plant Cell* **4**: 71-77.
- Mims, C.W. & Vaillancourt, L.J. (2002). Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola* and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology* **92**: 803-812.
- Moncada, P. & McCouch, S. (2004). Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* **47**: 501-509.
- Mould, M.J.R., Boland, G.J. & Robb, J. (1991). Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii* – *Medicago sativa* pathosystem. II. Post-penetration events. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **38**: 195-210 (In: Skipp *et al.*, 1995).
- Mulinge, S.K. (1971). Effect of altitude on the distribution of the fungus causing coffee berry disease in Kenya. *Annals of Applied Biology* **67**: 93-98.
- Muller, R.A. (1964). L'antracnose des baies du caféier d'arabie (*Coffea arabica*) due à *Colletotrichum coffeanum* Noack au Cameroun. *I.F.C.C. Bulletin* n° **6**: 9-38.
- Muller, R.A. (1973). L'évolution de l'antracnose des baies du caféier d'Arabie (*Coffea arabica* L.) due à une forme virulent du *Colletotrichum coffeanum* Noack. I. Variations de la sensibilité des fruits au cours de leur développement. II. L'irrigation, méthode préventive de contrôle de la maladie. *Café Cacao Thé*. **17**:281-312.

- Muller, R.A. (1980). Contribution à la connaissance de la phytomycocénose constituée par *Coffea arabica* L., *Colletotrichum coffeanum* Noack (sensu Hindorf), *Hemileia vastatrix* Ber. et Br., *Hemileia coffeicola* Maublanc et Roger. *I.F.C.C. Bulletin* n° 15, 176 pp.
- Muller, R.A. (1982). Some considerations on epidemiology of CBD in Kenya and Cameroon, importance of the disease, methods of evaluation of losses. *First Regional Workshop on Coffee berry disease*. Addis Abeba, Ethiopia, 19-24 July, 1982: 137-144.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. & Deising, H.B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* **165**: 41-51.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 369-386.
- Noack, N. (1901). Die krankheiten des kaffeebaumes in Brasilien. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **11**: 202 (In: Wrigley, 1988).
- Nutman, F.J. & Roberts, F.M. (1960a). Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack. I. Some factors affecting infection by the pathogen. *Transactions of the British Mycological Society* **43**: 489-505.
- Nutman, F.J. & Roberts, F.M. (1960b). Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack. II. Some factors affecting germination and infection and their relation to disease distribution. *Transactions of the British Mycological Society* **43**: 643-659.
- Nutman, F.J. & Roberts, F.M. (1961). Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack. III. The relation between infection of bearing wood and disease incidence. *Transactions of the British Mycological Society* **44**: 511-521.
- Ogle, H.J., Gowanlock, D.H. & Irwin, J.A.G. (1990). Infection of *Stylosanthes guinensis* and *S. scabra* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* **80**: 837-842 (In: Skipp et al., 1995).

- Omondi, C.O., Ayecho, P.O., Mwang'ombe, A.W. & Hindorf, H. (2000). Reaction of some *Coffea arabica* genotypes to strains of *Colletotrichum kahawae*, the cause of coffee berry disease. *Journal of Phytopathology* **148**: 61-63.
- Omondi, C.O., Hindorf, H., Welz, H.G., Saucke, D., Ayiecho, P.O. & Mwang'ombe, A.W. (1997). Genetic diversity among isolates of *Colletotrichum kahawae* causing coffee berry disease. *Proceedings of the 17th International Colloquium on Coffee (ASIC), Nairobi, Kenya, 20-25 July 1997*: 800-803.
- Omondi, C.O. & Pinard, F. (2006). Screening populations of Arabica coffee for molecular markers linked to coffee berry disease resistance. *Proceedings 21st International Conference on Coffee Science (ASIC), Montpellier, France, 11-15 September 2006*: 1377-1379.
- Orozco-Castillo, C., Chalmers, K.J., Powell, W. & Waugh, R. (1996). RAPD and organelle specific PCR reaffirms taxonomics relationships with the genus *Coffea*. *Plant Cell Reports* **15**: 337-341.
- Osório, N. (2002). The impact of the crisis of low coffee prices. *International Coffee Organization*, 4 pp.
- Pedro, J.M. (1996). *Controlo biológico da antracnose dos frutos de Coffea arabica pelo Bacillus subtilis em condições de laboratório*. INIA, EAN, Oeiras, 39 pp.
- Pedro, J.M., Martins, A.C., Azinheira, H.G., Silva, M.C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Gichuru, E.K., Rodrigues Jr., C.J. & Bertrand, B. (2004). Antagonistic interaction between *Bacillus subtilis* and *Colletotrichum kahawae* the causal agent of coffee berry disease. *Proceedings 20th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bangalore, India, 11-15 October 2004*, (Abstract).
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J. & Green, J.R. (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 186-198.
- Poncet, V., Rondeau, M., Tranchant, C., Cayrel, A., Hamon, S., de Kochko, A. & Hamon, P. (2006). SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Molecular Genetics and Genomics* **276**: 436-449.

- Purseglove J.W. (1974). *Tropical crops. Dicotyledons*. Longman. Singapore, 719 pp.
- Raina S.N., Mukai Y. & Yamamoto M. (1998). *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 1204-1209.
- Rayner, R. W. (1952). Coffee Berry Disease. A survey of investigations carried out up to 1950. *East African Agricultural and Forestry Journal* **17**: 130-158.
- Ride, J.P. (1985). Nonhost resistance to fungi. In: Faser, R.S.S. (Ed.). *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Nighoff, M. & Junk, W., Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, pp 29-61.
- Rijo, L. & Vasconcelos, M.I. (1984). Formação de calose e de lenhina em combinações incompatíveis *Coffea* sp. - *H. vastatrix*. *Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Comunicações*. Editado pelo Instituto de Investigação Científica Tropical. Oeiras, Portugal, 17-20 Outubro, pp 267-281.
- Robinson, R.A. (1974). *Terminal report of the FAO Coffee Pathologist to the Government of Ethiopia*. FAO, Rome (AGO/74/443), 16 pp.
- Rodrigues Jr., C.J. (2002). *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro*. Estudos e Ensaio. Edição Fundação Marquês de Pombal, Oeiras, Portugal, 55 pp.
- Rodrigues Jr., C. J., Gonçalves, M. & Várzea, V. M. (2004). Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias* **27**: 203-216.
- Rodrigues Jr., C.J., Várzea, V.M.P., Medeiros, E.F. (1992). Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack sensu Hindorf. *Kenya Coffee* **57**: 1417-1420.
- Ruas P.M., Ruas C., Rampim L., Carvalho V., Ruas E.A. & Sera T. (2003). Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 319-327.

- Saccas, A.M. (1965). L'antracnose des caféiers en République Centrafricaine. *Première Session du Groupe de Travail technique de la FAO sur la Production du Café et la Protection des Caféiers*, Octobre, Brésil, pp 1-7.
- Shimada, C., Lipka, V., O'Connell, R., Okuno, T., Schulze-Lefert, P. & Takano, Y. (2006). Nonhost resistance in *Arabidopsis* – *Colletotrichum* interactions acts at the cell periphery and requires actin filament function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 270-279.
- Silva, D., Talhinhos, P., Várzea, V., Loureiro, A., Silva, M.C., Paulo, O.S. & Batista, D. (2010). Population structure of *Colletotrichum kahawae* the causal agent of coffee berry disease (CBD): insights from a multi-locus approach. *Proceedings of the 23rd International Conference on Coffee Science (ASIC), Bali, Indonésia, 3-8 October 2010*, (in press).
- Silva, M.C. (1990). *Estudos histológicos na interação Coffea arabica-Hemileia vastatrix envolvendo certos genes de resistência. I. Efeito da heterozigocidade na expressão de resistência. II. Acção da temperatura nas expressões de susceptibilidade e de resistência*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 112 pp.
- Silva, M.C., Nicole, M., Guerra-Guimarães, L. & Rodrigues Jr., C.J. (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**: 169-183.
- Silva, M.C., Rijo, L. & Rodrigues Jr., C.J. (1985). Differences in aggressiveness of two isolates of race III of *Hemileia vastatrix* on cultivar Caturra of *Coffea arabica*. *Proceedings of the 11th International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC), Lomé, France, 11-15 February*, pp 635-645.
- Silva, M.C., Várzea, V.M.P., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H.G., Fernandez, D., Petiot, A., Bertrand, B., Lashermes, P. & Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 119-147.

- Skipp, R.A., Beever, R.E., Sharrock, K.R., Rikkerink, E.H.A. & Templeton, M.D. (1995). *Colletotrichum*. In: Kohmoto K, Singh US & Singh RP. (Eds.). *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical and Molecular Bases*. Volume II Eukaryotes. Elsevier Science Ltd. (Pergamon), Oxford, UK, pp 357-374.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. & Mills, P.R. (1993). Coffe Berry Disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycological Research* **97**: 995-1000.
- Sridhar, T.S. & Subramanian, S. (1968). Studies on brown eye spot disease (*Cercospora coffeicola* Berk & Cke.) of coffee (*Coffea arabica* L.). VI Cross inoculation studies. *Revista Patologia vegetarian* **4**: 33-39.
- Steiner, K.G. (1972). The influence of surface wax obtained from green berries of six selections of *Coffea arabica* on conidia of *Colletotrichum coffeanum*. *Kenya Coffee* **37**: 107-108.
- Thakur, R.P. & Shetty, K.G. (1993). Variation in pathogenicity among single-oospore isolates of *Sclerospora graminicola*, the casual organism of downy mildew in pearl millet. *Plant Pathology* **42**: 715-721.
- Torregrosa, C., Cluzet, S., Fournier, J., Thierry, H., Gamas, P., Prospéri, J-M., Ésquerré-Tugayé, M-T., Dumas, B. & Jacquet, C. (2004). Cytological, genetic and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 909-920.
- van der Graaff, N.A. (1981). *Selection of arabica coffee resistant to coffee berry disease in Ethiopia*. Doctoral thesis. Wageningen, The Netherlands, 110pp.
- van der Plank (1984). *Disease resistance in plants*. 2nd ed. Academic Press, Orlando, Florida. 206pp.
- van der Vossen, H.A.M. (1977). *Plant breeding. The effect of tonic sprays with fungicides on growth, yield, quality and CBD infection*. Annual Report of the Coffee Research Foundation, 1975/76. Kenya, pp 83-84.

- van der Vossen, H.A.M. (2006). State-of-the-Art of Developing Arabica Coffee Cultivars with Durable Resistance to Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*). *Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science (ASIC), Montpellier, France, 11-15 September 2006*: 794-801.
- van der Vossen, H.A.M., Cook, R.T.A. & Marakaru, G.N.W. (1976). Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of pre-selection for resistance. *Euphytica* **25**: 733-745.
- van der Vossen, H.A.M. & Walyaro, D.J. (1980). The inheritance of CBD resistance in arabica coffee. *Proceedings of the 9th International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC). Londres, UK, 16-20 June*: 543-546.
- van der Vossen, H.A.M. & Walyaro, D.J. (1981). The coffee breeding program in Kenya: A review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *Kenya Coffee* **46**: 113-130.
- van der Vossen, H.A.M. & Walyaro, D.J. (2009). Additional evidence for oligogenic inheritance of durable host resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Euphytica* **165**: 105-111.
- Várzea, V.M.P. (1990). *A antracnose dos frutos do cafeeiro causada pelo fungo Colletotrichum coffeanum*. Trabalho de síntese apresentado ao Instituto de Investigação Científica Tropical para acesso à categoria de assistente de investigação. Instituto de Investigação Científica Tropical. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, 32pp.
- Várzea, V.M.P. (1995). 1. *Variabilidade em Colletotrichum spp. de cafeeiro* 2. *Pesquisa de fontes de resistência ao C. kahawae*. Dissertação apresentada ao Instituto de Investigação Científica Tropical para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto de Investigação Científica Tropical. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, 128pp.
- Várzea, V.M.P., Rodrigues, Jr. C.J. & Lewis, B.G. (2002a). Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology* **51**: 202-207.

- Várzea, V.M.P., Rodrigues Jr, C.J., Medeiros, E. (1993). Different pathogenicity of CBD isolates on coffee genotypes. *Proceedings of the 15th International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC), Montpellier, France, 6-11 June 1993*: 303-308.
- Várzea, V.M.P., Silva, M.C.M.L., Rodrigues Jr.,C.J. (2002b). Resistência do cafeeiro à antracnose dos frutos verdes. *In: Zambolim L. (Ed.). O estado de Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Universidade Federal Viçosa, Brasil. pp 321-366.
- Vega, F.E., Posada, F. & Infante, F. (2006). Coffee Insects: Ecology and Control. *Encyclopedia of Pest Management* Doi: 10.1081/E-EPM- 120042132.
- Veneault-Fourrey, C., Laugé, R. & Langin, T. (2005). Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4761-4770.
- Vermeullen, H. (1970). Coffee berry disease in Kenya. I. *Colletotrichum spp.* Colonizing the bark of *Coffea arabica*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **76**: 277-284.
- Waller, J.M. (1972). Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. *Annals of Applied Biology* **71**: 1-18.
- Waller, J.M., Bridge, P.D., Black, R. & Hakiza, G. (1993). Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* **97**: 989-994.
- Walyaro, D.J. (1983). *Considerations in breeding for improved yield and quality in arabica coffee (Coffea arabica L.)*. PhD Thesis. Wageningen, The Netherlands.
- Wilson, K.C. (1985). Climate and Soil. *In: Clifford, M.N. & Wilson, K.C. (Eds.). Coffee: Botany, biochemistry, and production of beans and beverage*. Croom Helm, London & Sydney, pp 97:107.
- Wilson, C.L. (1997). Biological control and plant diseases – a new paradigm. *Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**: 158-159.
- Wrigley, G. (1988). *Coffee*. Tropical Agriculture Series. Longman Scientific & Technical, New York, 639 pp.

Anexos

Anexo I – Percentagem cumulativa de hypocótilos de diversos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com *C. kahawae* ao longo dos ensaios.

Quadro 1.1 - Percentagem cumulativa de hypocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
12859/3	1	83	96	100	100	100	100	100	100
12859/5	21	100	100	100	100	100	100	100	100
13682/8	9	66	74	89	100	100	100	100	100
13682/12	0	68	90	100	100	100	100	100	100
13682/40	6	100	100	100	100	100	100	100	100
13682/41	2	82	91	100	100	100	100	100	100
13682/42	0	77	81	94	97	97	97	97	97
13683/17	38	81	93	98	98	98	98	98	98
13683/18	13	74	90	93	94	96	96	96	96
13683/25	2	38	52	100	100	100	100	100	100
13683/35	1	53	57	96	97	100	100	100	100
13687/17	2	97	97	100	100	100	100	100	100
13726/2	1	70	74	90	95	96	97	97	97
Catimor 45	23	100	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.2 - Percentagem cumulativa de hypocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
12859/3	0	0	0	0	0	0	0	3	3
12859/5	0	0	0	0	0	0	0	2	6
13682/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13682/12	0	0	1	4	8	17	26	31	60
13682/33	0	0	0	8	21	31	38	46	51
13682/40	0	0	0	0	0	0	0	9	14
13682/41	0	0	0	1	2	8	20	32	47
13682/42	0	0	0	0	0	0	0	3	3
13683/17	0	0	0	3	8	13	15	28	35
13683/18	0	0	0	0	1	6	13	14	24
13683/25	0	0	0	0	2	2	2	8	8
13683/35	0	0	0	0	0	1	3	7	13
13687/17	0	0	0	0	2	3	3	13	17
13726/2	0	0	0	1	7	17	36	48	57
18863/112	0	0	0	4	11	22	22	22	33
Catimor 45	0	0	0	11	40	66	71	86	94

Quadro 1.3 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
12859/3	0	0	0	0	0	0	4	10	16
12859/5	0	0	0	0	0	0	2	4	10
13682/12	0	1	2	9	28	52	65	86	93
13682/41	0	0	0	2	16	19	32	43	58
13683/17	0	0	2	10	15	27	32	44	51
13683/18	0	0	0	3	6	13	16	49	56
13683/35	0	0	0	0	1	6	12	18	21
13687/17	0	0	0	0	5	5	15	25	32
13726/2	0	1	4	32	44	59	67	70	74
Catimor 45	0	3	14	69	83	86	91	94	94

Quadro 1.4 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
12859/3	0	0	0	0	0	0	0	1	4
12859/5	0	0	0	2	2	8	10	10	13
13682/12	0	4	18	45	62	68	76	84	89
13682/41	0	0	4	14	26	37	49	52	60
13683/17	0	0	0	10	17	22	22	24	29
13683/18	0	0	1	4	7	7	9	20	20
13683/35	0	0	0	3	3	3	4	6	9
13687/17	0	0	2	2	2	2	5	12	15
13726/2	0	0	2	2	4	4	6	6	9
Catimor 45	0	57	66	94	94	94	94	97	97

Quadro 1.5 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti20 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
12859/5	0	3	7	7	7	10	20	20	23
13682/12	0	0	9	27	33	47	53	54	58
13687/17	0	0	0	0	6	6	6	6	6
13726/2	0	0	0	0	0	3	4	4	12
Catimor 45	0	100	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.6 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti10 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiros	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13687/17	0	0	0	12	16	24	36	42	52
13726/2	0	0	9	17	21	36	51	59	59
Catimor 45	13	80	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.7 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Ang31 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13687/17	0	0	0	0	2	2	2	2	2
13726/2	0	0	0	0	0	0	1	3	4
Catimor 45	7	73	87	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.8 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13682/8	0	88	100	100	100	100	100	100	100
13682/33	0	88	93	100	100	100	100	100	100
13682/36	0	81	98	100	100	100	100	100	100
13682/40	25	100	100	100	100	100	100	100	100
13682/42	0	86	97	100	100	100	100	100	100
13683/21	15	100	100	100	100	100	100	100	100
13683/26	21	100	100	100	100	100	100	100	100
13726/25	0	83	97	97	97	97	97	97	97
Catimor 45	14	100	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.9 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/2	0	11	19	44	56	59	63	70	70
13682/8	0	0	0	0	0	0	15	18	18
13682/33	0	0	3	5	15	18	28	30	33
13682/36	0	0	0	7	14	16	16	23	28
13682/40	0	0	0	8	14	14	17	17	17
13682/42	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13683/21	0	0	3	8	21	21	28	33	41
13683/26	0	0	0	0	5	5	5	11	16
13726/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18863/43	0	0	3	8	15	28	35	43	45
18863/61	0	0	0	7	17	17	17	17	17
18863/112	0	0	0	15	31	38	54	54	54
Catimor 45	0	0	2	10	28	44	64	72	100

Quadro 1.10 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13683/21	0	0	3	3	15	15	18	23	28
Catimor 45	0	2	8	50	84	86	88	88	88

Quadro 1.11 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13683/25	0	0	0	18	33	38	46	67	82
Catimor 45	0	4	20	80	94	94	96	96	98

Quadro 1.12 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 4.

Genótipos de cafeeiro	3º Dia	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13478/2	0	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Catimor45	0	75	85	85	93	93	93	93	93	95	95

Quadro 1.13 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 4.

Genótipos de cafeeiro	3º Dia	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13478/2	0	0	38	53	100	100	100	100	100	100	100
Catimor45	0	0	10	20	50	85	93	93	98	100	100

Quadro 1.14 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 5.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
18863/61	12	84	96	100	100	100	100	100	100
13478/2	3	70	95	100	100	100	100	100	100
Catimor 45	0	22	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.15 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 5.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13726/25	0	0	0	0	0	0	6	11	17
Catimor 45	0	0	0	30	50	87	93	97	97

Quadro 1.16 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Ang31 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 5.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13478/2	0	0	38	88	100	100	100	100	100
Catimor 45	0	0	5	35	55	75	78	85	90

Quadro 1.17 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia
21193	0	0	1	28	47	59	72	81	89
21194	3	3	11	46	71	86	91	94	100
21195	0	0	0	28	61	69	86	89	89
21196	0	7	15	100	100	100	100	100	100
21197	0	0	0	47	70	85	92	94	96
Catimor 45	0	0	8	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.18 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti10 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia
21193	0	0	1	7	9	21	32	41	60
21195	0	0	0	0	0	14	27	41	57
21197	0	0	0	9	31	47	67	78	84
Catimor 45	0	0	0	5	18	38	58	63	98

Quadro 1.19 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	5º Dia	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia
21193	0	0	1	29	40	47	52	60	68
21195	0	3	11	24	38	59	76	81	86
21197	0	4	16	49	71	80	87	93	93
Catimor 45	6	11	19	22	36	53	64	75	100

Quadro 1.20 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	8	100	100	100	100	100	100	100	100
13485/2	3	57	73	80	87	100	100	100	100
13682/6	5	89	100	100	100	100	100	100	100
13682/9	5	100	100	100	100	100	100	100	100
13682/10	0	100	100	100	100	100	100	100	100
13682/36	3	96	100	100	100	100	100	100	100
13683/17	0	32	79	95	100	100	100	100	100
13683/25	7	82	100	100	100	100	100	100	100
13683/40	27	100	100	100	100	100	100	100	100
13687/17	18	100	100	100	100	100	100	100	100
13726/17	0	80	90	100	100	100	100	100	100
13726/20	4	100	100	100	100	100	100	100	100
13727/18	1	45	89	97	100	100	100	100	100
14412/6	20	100	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	1	27	100	100	100	100	100	100	100
18863/61	0	57	89	94	100	100	100	100	100
18863/314	1	81	100	100	100	100	100	100	100
Catimor 45	13	98	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.21 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	0	0	8	38	74	84	90	92	92
13485/2	0	0	10	17	33	40	43	50	50
13682/6	0	0	4	8	21	41	55	61	66
13682/9	0	4	13	22	31	35	42	44	53
13682/10	0	2	2	6	10	14	18	18	22
13682/36	0	2	7	18	39	44	51	55	58
13683/17	0	0	3	3	13	15	16	23	23
13683/25	0	7	21	32	50	54	61	75	79
13683/40	0	0	3	7	17	17	17	17	17
13687/17	0	0	7	11	18	21	29	29	29
13726/17	0	0	0	20	30	40	45	50	55
13727/18	0	0	1	1	6	6	7	7	11
14412/6	0	100	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	0	0	8	14	51	66	79	85	85
18863/61	0	0	49	77	90	96	100	100	100
18863/314	0	9	35	65	88	92	95	95	95
Catimor 45	0	6	23	37	58	64	74	82	88

Quadro 1.22 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	0	2	24	60	74	84	84	84	86
13485/2	0	0	0	7	10	10	23	27	33
13682/6	0	3	19	59	73	76	79	79	81
13682/9	0	0	31	51	60	60	64	64	67
13682/10	0	0	10	38	66	78	78	80	82
13682/36	0	0	8	23	40	53	57	60	60
13683/17	0	0	11	15	26	33	36	36	36
13683/25	0	0	14	32	43	43	57	64	68
13683/40	0	7	17	30	40	43	47	50	50
13687/17	0	0	14	21	25	32	36	39	46
13726/17	0	0	10	15	15	15	30	35	55
13726/20	0	0	0	0	8	12	20	20	20
13727/18	0	0	33	60	66	67	71	71	73
14412/6	0	57	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	0	0	17	47	80	87	94	96	96
18863/314	0	0	17	57	83	92	95	97	100
Catimor 45	0	6	30	48	73	80	84	90	92

Quadro 1.23 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti10 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	0	0	20	40	78	84	90	92	92
13485/2	0	0	7	7	43	53	63	67	70
13682/6	0	0	1	6	44	63	75	79	83
13682/9	0	0	5	11	49	58	65	69	71
13682/10	0	0	0	4	24	38	46	48	52
13682/36	0	0	0	5	31	51	65	74	76
13683/17	0	0	7	36	62	69	75	80	84
13683/25	0	0	4	4	54	68	79	82	82
13683/40	0	3	7	7	30	37	40	47	47
13687/17	0	0	4	7	18	29	32	32	36
13726/17	0	0	15	30	75	85	90	95	100
13726/20	0	0	0	0	8	24	24	28	40
13727/18	0	0	0	3	16	36	59	66	71
14412/6	0	63	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	0	0	0	18	76	89	93	95	96
18863/61	0	0	11	24	100	100	100	100	100
18863/314	0	0	16	41	85	96	96	96	96
Catimor 45	0	10	75	81	95	97	100	100	100

Quadro 1.24 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti20 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	0	12	58	80	84	86	88	90	94
13682/6	0	0	4	6	10	19	21	28	33
13682/9	0	5	13	15	24	24	25	29	35
13682/10	0	0	2	6	8	10	18	22	22
13682/36	0	0	2	6	14	24	34	39	49
13683/17	0	3	8	11	15	20	28	34	38
13683/40	0	3	14	17	41	45	52	62	62
13687/17	0	0	4	4	11	14	25	29	29
13727/18	0	1	6	6	11	27	37	44	47
13726/20	0	4	8	8	8	12	20	20	24
14412/6	17	100	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	0	0	6	16	39	59	64	67	75
18863/61	0	0	29	49	61	77	89	93	96
18863/314	0	0	12	31	56	75	83	85	88
Catimor 45	0	5	13	23	40	56	62	71	73

Quadro 1.25 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 9.

Genótipos de cafeeiro	6º Dia	8º Dia	10º Dia	12º Dia	14º Dia	16º Dia	18º Dia	20º Dia	22º Dia
13483/1	16	34	50	56	64	66	66	70	72
13485/2	0	0	0	0	0	3	3	7	10
13682/6	3	15	30	39	45	50	55	59	63
13682/9	5	45	60	65	67	69	69	73	73
13682/10	4	22	44	50	58	60	62	62	64
13683/17	3	13	25	39	43	49	56	56	56
13683/25	0	11	36	39	39	39	46	50	54
13683/40	10	63	80	87	87	87	87	87	87
13687/17	11	36	39	46	50	57	57	57	57
13726/17	0	20	20	30	30	35	40	45	45
13726/20	0	20	20	28	28	28	28	28	28
13727/18	7	20	37	43	44	47	56	60	61
14412/6	87	100	100	100	100	100	100	100	100
18863/22	0	25	39	61	69	74	79	86	87
18863/314	11	35	68	81	91	93	96	96	96
Catimor 45	22	54	72	80	86	88	90	92	93

Quadro 1.26 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13726/20	17	74	91	91	91	94	94	94	100
Catimor 45	30	100	100	100	100	100	100	100	100

Quadro 1.27 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Zim1 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13726/20	0	0	3	29	46	51	60	66	66
18863/61	0	1	20	73	90	96	97	97	98
Catimor 45	0	0	28	74	88	92	96	96	96

Quadro 1.28 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13682/6	0	1	8	33	35	45	52	52	65
13726/20	0	0	9	17	17	26	37	37	43
Catimor 45	0	0	26	48	62	80	84	84	94

Quadro 1.29 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Tan3 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13726/20	0	0	0	0	0	6	9	11	11
Catimor 45	0	0	0	4	10	14	20	22	28

Quadro 1.30 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti20 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13726/20	0	0	0	0	0	3	6	6	6
Catimor 45	0	0	6	14	32	54	58	60	68

Quadro 1.31 - Percentagem cumulativa de hipocótilos dos genótipos de cafeeiro com reacção 5, inoculados com o isolado Eti10 de *Colletotrichum kahawae*, ao longo do ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	7º Dia	9º Dia	11º Dia	13º Dia	15º Dia	17º Dia	19º Dia	21º Dia	23º Dia
13726/20	0	0	0	0	1	3	7	13	21
Catimor 45	0	0	0	2	9	22	44	69	99

Anexo II – Índice de Agressividade

Quadro 2.1 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 1.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
21148	-	-	-	-	300	300	1,0
21149	-	-	15	1	278	294	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	111	111	1,0

Quadro 2.2 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 1.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
21148	-	-	8	3	109	120	1,0
21149	-	-	45	6	67	118	0,8
Catimor 45	-	-	3	1	99	103	1,0

Quadro 2.3 – Índice de Agressividade (IA), de 14 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
12859/3	-	-	-	-	70	70	1,0
12859/5	-	-	-	-	48	48	1,0
13682/8	-	-	-	-	35	35	1,0
13682/12	-	-	-	-	100	100	1,0
13682/40	-	-	-	-	35	35	1,0
13682/41	-	-	-	-	90	90	1,0
13682/42	-	-	-	1	30	31	1,0
13683/17	-	-	1	-	41	42	1,0
13683/18	-	-	1	-	67	70	1,0
13683/25	-	-	-	-	50	50	1,0
13683/35	-	-	-	-	68	68	1,0
13687/17	-	-	-	-	60	60	1,0
13726/2	-	1	1	1	91	94	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	35	35	1,0

Quadro 2.4 – Índice de Agressividade (IA), de 16 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
12859/3	-	65	3	-	2	70	0,4
12859/5	-	-	45	-	3	48	0,6
13682/8	-	32	3	-	0	35	0,4
13682/12	-	6	22	11	59	99	0,8
13682/33	-	8	8	-	20	39	0,7
13682/40	-	22	6	2	5	35	0,5
13682/41	-	39	4	5	42	90	0,7
13682/42	-	30	-	-	1	31	0,4
13683/17	-	-	12	2	14	40	0,6
13683/18	-	48	5	-	17	70	0,6
13683/25	-	41	4	-	4	50	0,5
13683/35	-	49	6	-	9	68	0,5
13687/17	-	47	3	-	10	60	0,5
13726/2	-	40	-	-	54	94	0,7
18863/112	-	-	18	-	9	27	0,7
Catimor 45	-	-	2	1	33	35	1,0

Quadro 2.5 – Índice de Agressividade (IA), de 10 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Zimbabué, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
12859/3	-	51	4	4	11	70	0,5
12859/5	-	35	4	4	5	48	0,5
13682/12	-	3	2	2	93	100	1,0
13682/41	-	28	5	5	52	90	0,8
13683/17	-	13	7	-	21	41	0,7
13683/18	-	38	8	5	39	70	0,9
13683/35	-	34	12	6	14	68	0,6
13687/17	-	22	4	5	19	60	0,6
13726/2	-	15	8	1	70	94	0,9
Catimor 45	-	-	-	2	33	35	1,0

Quadro 2.6 – Índice de Agressividade (IA), de 10 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
12859/3	-	52	9	6	3	70	0,5
12859/5	-	-	31	11	6	48	0,7
13682/12	-	-	9	12	79	100	0,9
13682/41	-	-	29	7	54	90	0,9
13683/17	-	16	11	2	12	41	0,6
13683/18	-	29	19	8	14	70	0,6
13683/35	-	-	54	8	6	68	0,7
13687/17	-	10	38	3	9	60	0,6
13726/20	-	82	3	1	8	94	0,5
Catimor 45	-	-	1	-	34	35	1,0

Quadro 2.7 – Índice de Agressividade (IA), de 5 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (Eti20), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
12859/5	-		23	-	7	30	0,7
13682/12	-	5	28	14	53	100	0,8
13687/17	-	35	8	4	3	50	0,5
13726/20	-	1	4	1	9	75	0,2
Catimor 45	-	-	-	-	15	15	1,0

Quadro 2.8 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (Eti10), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13687/17	-	-	16	8	26	50	0,8
13726/20	-	24	6	1	44	75	0,8
Catimor 45	-	-	-	-	15	15	1,0

Quadro 2.9 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de Angola, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 2.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13687/17	-	26	15	8	1	50	0,5
13726/20	-	21	48	3	3	75	0,6
Catimor 45	-	-	-	-	15	15	1,0

Quadro 2.10 – Índice de Agressividade (IA), de 9 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13682/8	-	-	-	-	33	33	1,0
13682/33	-	-	-	-	40	40	1,0
13682/36	-	-	-	-	43	43	1,0
13682/40	-	-	-	-	36	36	1,0
13682/42	-	-	-	-	29	29	1,0
13683/21	-	-	-	-	39	39	1,0
13683/26	-	-	-	-	10	19	0,5
13726/25	-	-	-	1	34	35	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	50	50	1,0

Quadro 2.11 – Índice de Agressividade (IA), de 13 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/2	-	-	4	4	19	27	0,9
13682/8	-	21	5	1	6	33	0,6
13682/33	-	20	4	3	13	40	0,6
13682/36	-	23	5	3	12	43	0,6
13682/40	-	23	3	4	6	36	0,6
13682/42	-	26	3	-	0	29	0,4
13683/21	-	14	9	-	16	39	0,7
13683/26	-	14	2	-	3	19	0,5
13726/25	-	32	2	1	0	35	0,4
18863/43	-	-	19	3	18	40	0,8
18863/61	-	5	19	1	5	30	0,6
18863/112	-	-	4	2	7	13	0,8
Catimor 45	-	-	-	-	50	50	1,0

Quadro 2.12 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Zimbabuê, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13683/25	-	-	4	2	33	39	0,9
Catimor 45	-	-	-	1	49	50	1,0

Quadro 2.13 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 3.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13683/21	-	21	7	-	11	39	0,6
Catimor 45	-	-	-	-	50	50	1,0

Quadro 2.14 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 4.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13478/2	-	-	-	-	40	40	1,0
13683/42	-	-	1	-	26	28	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	40	40	1,0

Quadro 2.15 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT) no ensaio 4.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13478/2	-	-	-	10	30	40	1,0
Catimor 45	-	-	4	2	31	40	0,9

Quadro 2.16 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 5.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13478/2	-	-	-	-	60	60	1,0
18863/61	-	-	-	-	25	25	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	60	60	1,0

Quadro 2.17 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 5.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13726/25	-	-	13	2	3	18	0,7
Catimor 45	-	-	1	-	29	30	1,0

Quadro 2.18 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (Eti10), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 4.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13478/2	-	-	-	-	40	40	1,0
Catimor 45	-	-	4	-	36	40	1,0

Quadro 2.19 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 6.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
832/2	-	-	5	3	67	75	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	72	72	1,0

Quadro 2.20 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 6.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
832/2	-	43	21	3	8	75	0,5
Catimor 45	-	-	2	4	69	75	1,0

Quadro 2.21 – Índice de Agressividade (IA), de 6 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Zimbabué, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
21193	-	-	11	1	63	75	0,9
21194	-	-	-	-	35	35	1,0
21195	-	-	2	2	32	36	1,0
21196	-	-	-	-	27	27	1,0
21197	-	1	-	1	51	53	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	40	40	1,0

Quadro 2.22 – Índice de Agressividade (IA), de 4 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
21193	-	3	21	-	51	75	0,9
21195	-	-	3	2	32	37	1,0
21197	-	1	3	-	51	55	1,0
Catimor 45	-	-	9	1	26	36	0,9

Quadro 2.23 – Índice de Agressividade (IA), de 4 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (ET110), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 7.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
21193	-	15	12	2	46	75	0,8
21195	-	-	15	1	21	37	0,8
21197	-	-	9	-	46	55	0,9
Catimor 45	-	-	7	2	31	40	0,9

Quadro 2.24 – Índice de Agressividade (IA), de 18 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	-	-	-	50	50	1,0
13485/2	-	-	-	-	30	30	1,0
13682/6	-	-	-	-	80	80	1,0
13682/9	-	-	-	-	55	55	1,0
13682/10	-	-	-	-	50	50	1,0
13682/36	-	-	-	-	100	100	1,0
13683/17	-	-	-	-	63	63	1,0
13683/25	-	-	-	-	28	28	1,0
13683/40	-	-	-	-	30	30	1,0
13687/17	-	-	-	-	28	28	1,0
13726/17	-	-	-	-	20	20	1,0
13726/20	-	-	-	-	25	25	1,0
13727/18	-	-	-	-	71	71	1,0
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	-	-	-	100	100	1,0
18863/61	-	-	-	-	70	70	1,0
18863/314	-	-	-	-	75	75	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	100	100	1,0

Quadro 2.25 – Índice de Agressividade (IA), de 17 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Zimbabué, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	-	7	-	43	50	0,9
13485/2	-	-	17	3	10	30	0,8
13682/6	-	-	11	4	65	80	0,9
13682/9	-	-	13	5	37	55	0,9
13682/10	-	-	6	3	41	50	0,9
13682/36	-	-	37	3	60	100	0,8
13683/17	-	26	7	6	22	61	0,7
13683/25	-	-	8	1	19	28	0,9
13683/40	-	-	7	8	15	30	0,9
13687/17	-	-	10	5	13	28	0,8
13726/17	-	-	9	-	11	20	0,8
13726/20	-	6	8	6	5	25	0,7
13727/18	-	-	11	8	51	70	0,9
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	-	2	2	96	100	1,0
18863/314	-	-	-	-	75	75	1,0
Catimor 45	-	-	6	2	92	100	1,0

Quadro 2.26 – Índice de Agressividade (IA), de 18 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Tanzânia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	-	1	3	46	50	1,0
13485/2	-	-	15	-	15	30	0,8
13682/6	-	15	12	-	53	80	0,8
13682/9	-	-	24	2	29	55	0,8
13682/10	-	-	35	4	11	50	0,7
13682/36	-	-	42	-	58	100	0,8
13683/17	-	8	34	5	14	61	0,7
13683/25	-	-	3	3	22	28	0,9
13683/40	-	-	25	-	5	30	0,7
13687/17	-	2	15	3	8	28	0,7
13726/17	-	-	5	4	11	20	0,9
13726/20	-	-	4	21	0	25	0,8
13727/18	-	39	22	-	9	70	0,5
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	-	9	6	85	100	1,0
18863/61	-	-	-	-	70	70	1,0
18863/314	-	-	2	2	71	75	1,0
Catimor 45	-	-	10	2	88	100	1,0

Quadro 2.27 – Índice de Agressividade (IA), de 15 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (Eti20), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	3	-	-	47	50	1,0
13682/6	-	-	40	14	26	80	0,8
13682/9	-	10	15	11	19	55	0,7
13682/10	-	7	25	7	11	50	0,7
13682/36	-	-	35	16	49	100	0,8
13683/17	-	-	19	19	23	61	0,8
13683/40	-	-	14	4	18	29	1,0
13687/17	-	-	14	6	8	28	0,8
13726/20	-	-	13	6	6	25	0,7
13727/18	-	-	33	4	33	70	0,8
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	-	15	10	75	100	0,9
18863/61	-	-	-	3	67	70	1,0
18863/314	-	-	6	3	66	75	1,0
Catimor 45	-	-	25	2	73	100	0,9

Quadro 2.28 – Índice de Agressividade (IA), de 18 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes da Etiópia (Eti10), a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 8.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	-	-	4	46	50	1,0
13485/2	-	-	7	2	21	30	0,9
13682/6	-	-	10	4	66	80	0,9
13682/9	-	-	13	3	39	55	0,9
13682/10	-	-	13	11	26	50	0,9
13682/36	-	-	17	7	76	100	0,9
13683/17	-	-	7	3	51	61	0,9
13683/25	-	-	4	1	23	28	0,9
13683/40	-	-	13	3	14	30	0,8
13687/17	-	4	11	3	10	28	0,7
13726/17	-	-	-	-	20	20	1,0
13726/20	-	5	10	-	10	25	0,7
13727/18	-	-	15	5	50	70	0,9
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	-	3	1	96	100	1,0
18863/61	-	-	-	-	70	70	1,0
18863/314	-	-	-	3	72	75	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	100	100	1,0

Quadro 2.29 – Índice de Agressividade (IA), de 16 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 9.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13483/1	-	-	10	4	36	50	0,9
13485/2	-	10	16	1	3	30	0,6
13682/6	-	-	26	4	50	80	0,9
13682/9	-	2	7	6	40	55	0,9
13682/10	-	-	17	1	32	50	0,9
13683/17	-	-	24	3	34	61	0,8
13683/25	-	3	10	-	15	28	0,8
13683/40	-	-	2	2	26	30	1,0
13687/17	-	7	3	2	16	28	0,8
13726/17	-	-	9	2	9	20	0,8
13726/20	-	-	15	3	7	25	0,7
13727/18	-	-	19	8	43	70	0,9
14412/6	-	-	-	-	30	30	1,0
18863/22	-	3	10	-	87	100	0,9
18863/314	-	-	2	1	72	75	1,0
Catimor 45	-	-	4	3	93	100	1,0

Quadro 2.30 – Índice de Agressividade (IA), de 2 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes dos Camarões, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13726/20	-	-	-	-	35	35	1,0
Catimor 45	-	-	-	-	50	50	1,0

Quadro 2.31 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Quênia, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reacção (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13682/6	-	10	19	6	65	100	0,9
13726/20	-	11	8	1	15	35	0,7
Catimor 45	-	-	2	1	47	50	1,0

Quadro 2.32 – Índice de Agressividade (IA), de 3 genótipos de cafeeiro inoculados com isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes do Zimbabuê, a leitura do número de hipocótilos em cada classe de reação (segundo a escala de van der Graaff, 1981) e o número de hipocótilos testados (NHT), no ensaio 10.

Genótipos de cafeeiro	R1	R2	R3	R4	R5	NHT	IA
13726/20	-	-	9	3	23	35	0,9
18863/61	-	-	1	-	99	100	1,0
Catimor 45	-	-	-	2	48	50	1,0

Anexo III – Tratamento estatístico

Quadro 3.1 – Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados de diferentes genótipos, 10 dias após a inoculação com o isolado Cam1 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipos de cafeeiro	Crescimento médio do isolado Cam1 (mm)
13682/12	4,11±1,19 a
13683/42	4,22±1,19 ab
13687/17	4,33±1,25 ab
13726/25	4,34±0,70 ab
13683/26	4,56±0,89 abc
13682/40	4,64±0,98 abc
13682/36	4,80±1,40 abcd
13478/2	4,82±1,35 abcd
13683/25	4,97±1,41 cd
13682/42	4,97±0,95 cd
13683/21	4,98±0,97 bcd
13682/8	5,10±1,09 cd
Catimor 45	5,19±1,19 d

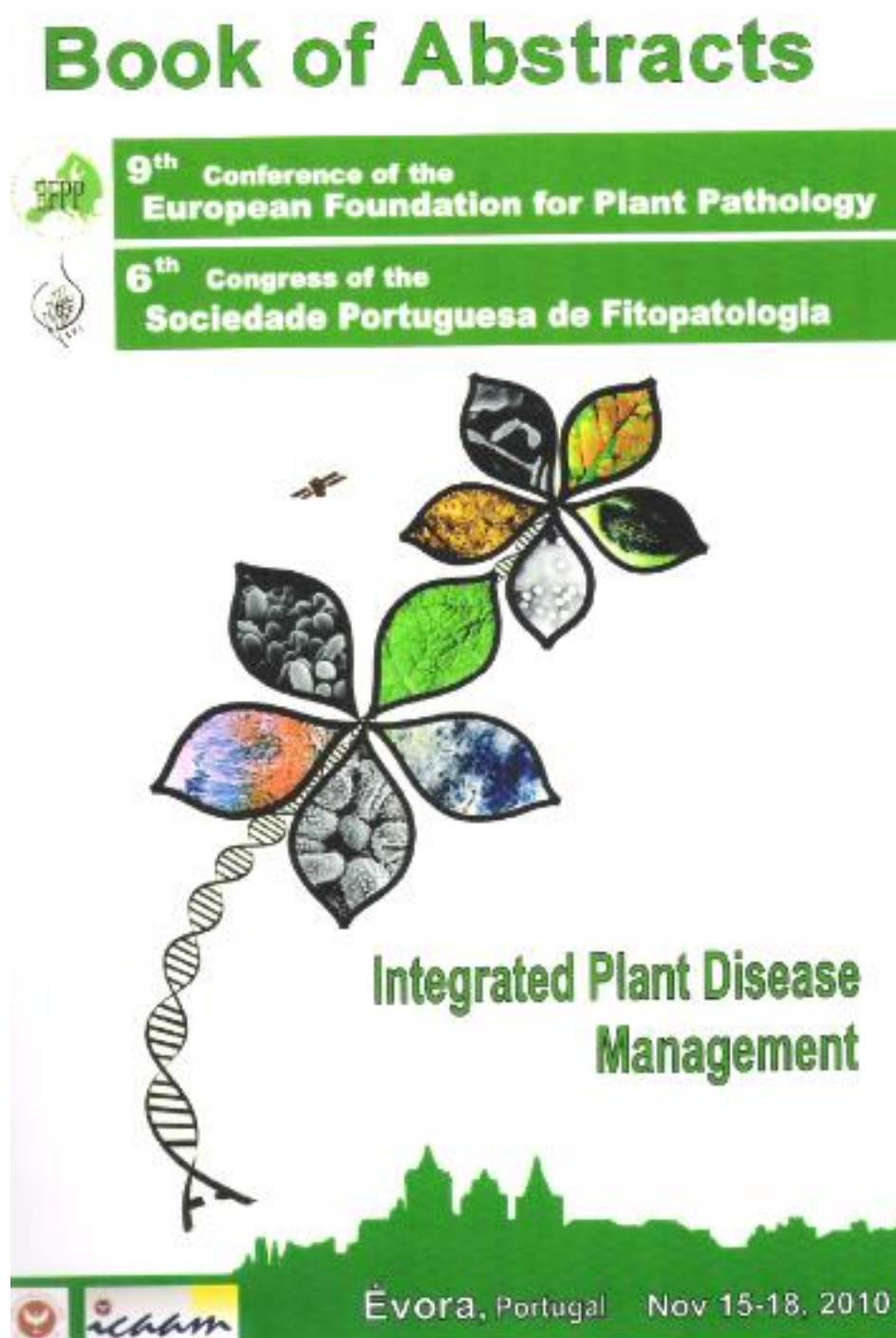
Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$); ($\bar{x} \pm DP$) média \pm desvio padrão.

Quadro 3.2 – Diâmetro médio (mm) das lesões em frutos verdes destacados de diferentes genótipos, 10 dias após a inoculação com o isolado Que2 de *Colletotrichum kahawae*.

Genótipos de cafeeiro	Crescimento médio do isolado Que2 (mm)
13682/12	2,78±1,54 ab
13683/42	2,88±1,07 ab
13683/26	2,90±1,09 a
13687/17	3,07±1,16 ab
13726/25	3,10±1,24 ab
13682/36	3,21±1,22 ab
13682/40	3,35±1,03 ab
13683/21	3,65±0,99 abc
13682/8	3,69±1,17 bc
13682/42	4,29±1,34 cd
13478/2	4,36±1,41 cde
Catimor 45	4,38±0,99 d
13683/25	5,02±1,46 e

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$); ($\bar{x} \pm DP$) média \pm desvio padrão.

Anexo IV – Resumo e painel apresentado em Congresso Internacional



P2.6 Indian coffee selections with resistance to Coffee Berry Disease

André Parada^{1,2}, Ana P. Pereira², Andreia S. Loureiro¹, Maria C. Silva¹, Akundi S. Ram³, Sudakat S. Bhat³, Arlindo Lima², Nayani S. Prakash³ and Vitor M.P. Várzea¹

¹Centro de Investigação das Ferrugens do Café/Instituto de Investigação Científica Tropical, 2784-505 Oeiras, Portugal.

²Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal.

³Central Coffee Research Institute, CRS Post 577 177, Chikmagalur, Karnataka, India.

Corresponding author: vitorvarzea@ciat.pt

Coffee is one of the most valuable primary products in world trade being crucial to the economies of many developing countries. Its production is, however constrained by a number of major diseases, including Coffee Berry Disease (CBD) caused by *Colletotrichum kahawae*. This disease may destroy up to 80% of the coffee berries if no control measures are taken. Presently, CBD is confined to Africa and poses a serious threat if it spreads to coffee growing countries of other continents. Selection for resistance to CBD has been based either on seedling inoculation method (pre-selection test) or field expression of resistance on mature trees. At the Coffee Rust Research Center (CIRC) in Portugal, search for new sources of resistance to CBD pathogen has been a focused activity. In the present paper we report the potential of some coffee genotypes from India as sources of resistance to CBD. Some of the interspecific derivatives of Indian origin such as S. 795, Sin 11, Sin 5A and Sin 6 exhibit different levels of resistance against *C. kahawae* isolates from Kenya, Zimbabwe and Cameroon, as compared to the susceptible coffee cultivar Catimor 45. Histological studies of S. 795 and Sin 11 are currently under progress aiming a better characterization of the expression of resistance of these genotypes to *C. kahawae*. The selections Sin 5A and Sin 6 are already under field evaluation in four African countries as part of multi-country programme supported by ICO-CFC (project nº. CFC/ICO/40).

Keywords: *Colletotrichum kahawae*, resistance breeding, CBD

Indian coffee selections with resistance to Coffee Berry Disease

André Parada^{1,2}, A. Paula Pereira¹, Andreia S. Loureiro¹, Maria C. Silva¹, Akundi S. Ram³, Sudakat S. Bhat³, Arlindo Lima², Nayani S. Prakash³ and Vítor M.P. Várzea^{1*}



¹ IICT-CIFC - Instituto de Investigação Científica Tropical Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Quinta do Marquês, 2784-505, Oeiras, Portugal;

² Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa;

³ Central Coffee Research Institute, CRS Post 577 177, Chikmagalur, Karnataka, India.

*Corresponding author: vitorvarzea@clix.pt



Introduction

Coffee is one of the most valuable primary products in world trade being crucial to the economies of many developing countries. However its production is constrained by a number of major diseases, including Coffee Berry Disease (CBD) caused by *Colletotrichum kahawae*. This disease is responsible for up to 80% of crop losses, if no control measures are taken. Presently, CBD is confined to Africa and poses a serious threat if it spreads to coffee growing countries in other continents. Selection for resistance to CBD has been based either on seedling inoculation methods (pre-selection test) or field expression of resistance on mature trees. Screening tests and cytological studies have been carried out to evaluate the resistance of different cultivars from India, with CBD isolates from Kenya and Cameroon, aiming to find and characterize new sources of resistance to *C. kahawae*.



Fig. 1 – Coffee Berry Disease

Results

Screening tests:

The screening tests were performed on the Indian cultivars (Sln 5A, Sln 6, S. 795, Sln 11) and susceptible control (Catimor 45) inoculated with isolates from Kenya (Que2) and Cameroon (Cam1) according to the technique described by van der Vossen *et al.* (1976). The progression of the disease on cultivar Sln 11 and S. 795 was lower comparatively with the control Catimor 45 (Fig. 2a, 3a, 2c, 3c) particularly when tested with the CBD isolate from Kenya (Fig. 3a,c). The cultivars Sln 6 and Sln 5A showed high level of resistance when inoculated with the Kenya isolate (Fig. 3b). Sln 6 showed no differences to control Catimor 45 when inoculated with the isolate Cam 1. On the other hand the cultivar Sln 5A showed more resistance than the control until 14 days after inoculation (Fig. 2b).

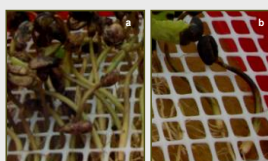
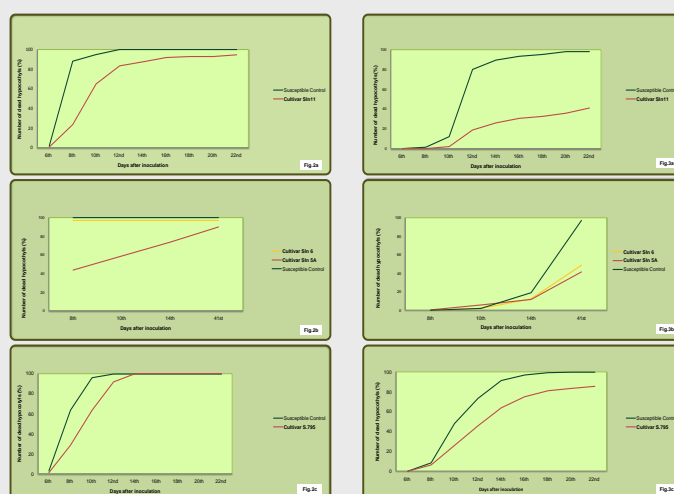


Fig. 4. Screening tests: Fig. 4a. Cultivar Sln 11 inoculated with the isolate Que2, 10 days after inoculation (dai). Fig. 4b. Cultivar Catimor 45 inoculated with isolate Cam1, 10 dai.



Figs. 2 – 3. Disease evolution in different Indian coffee cultivars inoculated with *Colletotrichum kahawae* isolates Cam1 (Fig. 2a-c) and Que2 (Fig. 3a-c).

Cytological studies:

The Indian cultivars Sln11, S795 and the susceptible control (Catimor 45) were selected for cytological studies. The early stages of both *C. kahawae* isolates (Cam1 and Que2) growth were similar in all coffee cultivars. Conidia adhered to the hypocotyls cuticle and germinated producing germ tubes and melanized appressoria, which penetrated directly into the epidermal cell walls with the formation of infection vesicles that grew intra- and intercellularly (Fig. 5). However, in Sln11 both fungal isolates presented a lower hyphal length comparatively to Catimor 45, while in S. 795 the fungal growth did not differ significantly from Sln 11 and Catimor 45 (Fig. 6, 7).

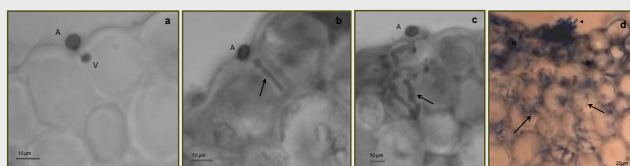


Fig. 5. Infection process of Cam1 isolate on hypocotyls of cultivars Sln 11 (Figs. 5a,b,c) and Catimor 45 (Figs. 5d). Light Microscope (LM) observations, blue lactophenol staining. Fig. 5a. Infection site showing a melanized appressoria (A) and an infection vesicle (V), 48 h after inoculation. Fig. 5b. Infection site showing a melanized appressoria (A) and an intracellular hypha (arrow), 72 h after inoculation. Fig. 5c. Infection site with a melanized appressoria (A) and inter- and intracellular hyphal growth (arrow), 72 h after inoculation. Fig. 5d. Fungal hyphae (arrows) in living and in necrotized (n) host cells and beginning of sporulation (arrowhead), 7 days after the inoculation.

As previously described by Silva *et al.* (2006), the susceptibility (observed in 100% of Catimor 45 hypocotyls and in lower percentages of hypocotyls of Sln 11 and S.795) involved an hemibiotrophic fungal growth and the symptoms corresponded to dark sunken lesions with sporulation. In Sln 11 and S.795, hypocotyls with symptoms of resistance (scab lesion) were also observed and corresponded to fungal colonization associated with the deposition of callose around some intracellular hyphae and modifications in the host cell walls (autofluorescence indicative of the accumulation of phenolic compounds) (Fig.8).

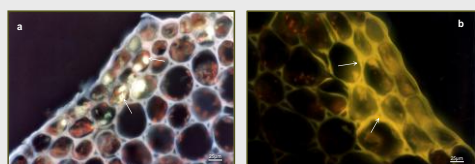


Fig. 8. Cellular responses induced by the isolate Que2 in hypocotyl cells of the cultivar Sln 11, 10 days after inoculation. LM observations. Fig. 8a. Callose around intracellular hyphae (arrows), aniline blue test. Fig. 8b. Infection area showing autofluorescence of host cell walls (arrows), epifluorescence test under blue light.

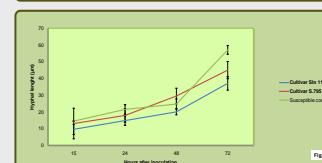
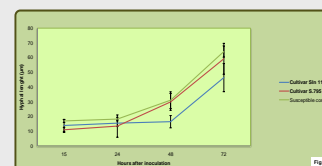


Fig. 6 – 7. Post - penetration growth of isolates Cam1 (Fig. 6) and Que2 (Fig. 7) in the Indian cultivars Sln11, S.795 and in the susceptible control Catimor 45 at 15, 24, 48 and 72 hours after inoculation.

Conclusions

The Indian cultivars studied revealed a moderate level of resistance to the isolates tested what may correspond to potential field tolerance. For a better characterization of their spectra of resistance they will be inoculated with *C. kahawae* isolates from other geographic origins.

References:

Van der Vossen HAM, Cook RTA & Marakuru GNW (1976). *Euphytica* 25:733-745.
Silva MC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Pettit A-S, Bertrand B, Lathieries P, Nicole M (2006). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 119-147.

